

Universitätsklinikum Jena
Institut für Medizinische Mikrobiologie

Molekulare Mechanismen der BCG Therapie beim nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinom

Dissertation

zu Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr.re.nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät

der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplom Biologin Katja Schwarzer

geb. 11.03.1979 in Gera

Jena, im August 2010

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. E. Straube
2. Prof. Dr. med. H. Wunderlich
3. AOR Dr. T. Ölschläger

Tag der öffentlichen Disputation: 28.02.2011

Denn wir sind nur die Schale und das Blatt

*Der große Tod, den jeder in sich hat,
das ist die Frucht, um die sich alles dreht.*

R.M. Rilke

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	1
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	5
1 EINLEITUNG	6
1.1 DAS HARNBLASENKARZINOM	6
1.1.1 EPIDEMIOLOGIE UND INZIDENZ	6
1.1.2 ÄTIOLOGIE	7
1.1.3 PATHOGENESE UND HISTOLOGIE/-TNM KLASSEFİKATION NACH EİTEILUNG DER WHO 2004	8
1.1.4 DIAGNOSTIK.....	8
1.1.5 MOLEKULARE MARKER.....	9
1.2 THERAPIE DES NMIBC.....	10
1.2.1 PHOTODYNAMISCHE THERAPIE (PDT)	10
1.2.2 İNTRAVESİKALE CHEMOTHERAPIE AM BEİSPIEL DOXORUBICIN.....	11
1.2.3 <i>MYKOBACTERIUM BOVIS</i> SSP. <i>BACILLUS-CALMETTE-GUÉRIN</i> (BCG)	11
1.3 BCG STAMM S4-JENA - EIN ÜBERBLICK ÜBER DIE GESCHICHTE UND DIE GROÖE BCG-FAMILIE	14
1.3.1 S4-JENA BCG HISTORIE.....	15
1.3.2 BCG S4-JENA	16
1.4 KARZİNOMENTSTEHUNG	17
1.4.1 REGULATION DES ZELLZYKLUS	18
1.4.2 REGULATION DER APOPTOSE	19
1.5 ZIELSTELLUNG DER ARBEIT	21
2 METHODEN.....	22
2.1 ZELLINIEN.....	22
2.1.1 KULTURBEDİNGUNGEN DER ZELLINIEN	22
2.1.2 ANZUCHT UND VERMEHRUNG DER ZELLINIEN.....	22
2.1.3 BESTİMİUNG DER ZELLZAHL UND VİTALİTÄTSPRÜFUNG	22
2.1.4 EİNFRIEREN UND AUFTAUEN DER ZELLINIEN	23
2.1.5 MYCOPLASMENTEST.....	23
2.2 BCG-STÄMME.....	24
2.2.1 KULTIVIERUNG DES S4-JENA BCG STAMMES.....	24
2.3 MOLEKULARBİOLOGISCHE METHODEN.....	25

2.3.1	PULSFELDGELELEKTROPHORESE	25
2.3.2	PROLIFERATIONSMESSUNG MITTELS WST-1-TEST (ROCHE)	26
2.3.3	IMMUNFLUORESCENZMESSUNG AM DURCHFLUSSZYTOMETER	26
2.3.3.1	Präparation der Zellen für die Durchflusszytometrie	27
2.3.3.2	Zellzyklusanalyse mittels Nicoletti-Färbung.....	28
2.3.3.3	Apoptosemessung mittels AnnexinV–FITC/Propidiumiodid Assay.....	28
2.3.3.4	Nachweis der Internalisierung von BCG in Zellen	29
2.3.4	IMMUNFLUORESCENZ-ANALYSE AM KONFOKALEN LASER SCANNING MIKROSKOP	29
2.3.4.1	Immunfluoreszenz-Färbung zum Apoptose Nachweis	30
2.3.4.2	Immunfluoreszenz-Färbung zum Internalisierungsversuch.....	30
2.4	RASTERELEKTRONENMIKROSKOPIE.....	31
2.4.1	AUFARBEITUNG UND SCANNEN DER PROBEN.....	31
2.5	GENEXPRESSIONSANALYSE	31
2.5.1	RNA-ISOLIERUNG	32
2.5.2	MICROARRAYANALYSE	32
2.6	POLYKETIDANALYSE	33
2.6.1	HSQC NMR.....	33
2.6.2	MS HPLC	33
2.7	STATISTISCHE AUSWERTUNG	34
3	<u>ERGEBNISSE</u>	<u>35</u>
3.1	KLONALE UNTERSCHIEDE DER BCG STÄMME.....	36
3.2	EFFEKT DER S4-JENA UND TICE EXPOSITION AUF DIE GENEXPRESSION DER HARNBLASENKARZINOMZELLINIEN T24 UND CAL29.....	37
3.2.1	EFFEKT DER S4-JENA UND TICE EXPOSITION AUF DIE GENEXPRESSION VON T24 ZELLEN	37
3.2.2	EFFEKT DER S4-JENA UND TICE EXPOSITION AUF DIE GENEXPRESSION VON CAL29 ZELLEN.....	42
3.3	ZUSAMMENFASSUNG DER GENEXPRESSION.....	46
3.4	ADHÄRENZ- UND INTERNALISIERUNGSVERHALTEN DER BCG STÄMME S4-JENA UND TICE NACH EXPOSITION VON T24 UND CAL29 ZELLEN	47
3.4.1	ADHÄRENZ- UND INTERNALISIERUNGSVERHALTEN VON S4-JENA UND TICE NACH EXPOSITION VON T24 ZELLEN.....	48
3.4.2	ADHÄRENZ- UND INTERNALISIERUNGSVERHALTEN VON S4-JENA UND TICE NACH EXPOSITION VON CAL29 ZELLEN.....	52
3.5	EINFLUSS DER EXPOSITION MIT S4-JENA UND TICE AUF DAS PROLIFERATIONSVERHALTEN VON T24 UND CAL29	55

3.5.1	EFFEKT DER S4-JENA UND TICE EXPOSITION AUF DAS PROLIFERATIONSVERHALTEN VON T24 ZELLEN	55
3.5.2	EFFEKT DER S4-JENA UND TICE EXPOSITION AUF DAS PROLIFERATIONSVERHALTEN VON CAL29 ZELLEN .	57
3.6	EINFLUSS DER EXPOSITION MIT S4-JENA UND TICE AUF DEN ZELLZYKLUS VON T24 UND CAL29 ZELLEN..	59
3.6.1	EFFEKT DER S4-JENA UND TICE EXPOSITION AUF DEN ZELLZYKLUS VON T24 ZELLEN	59
3.6.2	DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSE DES ZELLZYKLUS VON T24 ZELLEN NACH EXPOSITION MIT S4-JENA UND TICE.....	62
3.6.3	EFFEKT DER S4-JENA UND TICE EXPOSITION AUF DEN ZELLZYKLUS VON CAL29 ZELLEN	63
3.7	EINFLUSS DER EXPOSITION MIT S4-JENA UND TICE AUF DIE APOPTOSE VON T24 UND CAL29	67
3.7.1	NACHWEIS DER APOPTOSEINDUKTION MITTELS TRANSLOKATION VON PHOSPHATIDYLSERIN (ANNEXIN V) IN VERBINDUNG MIT PROPIDIUMIODID (PI)	68
3.7.2	NACHWEIS DER APOPTOSEINDUKTION MITTELS LASER SCANNING MIKROSKOPIE	72
3.7.3	KORRELATION ZWISCHEN APOPTOSEINDUKTION UND INTERNALISIERUNG DER BCG	76
3.7.4	MORPHOLOGISCHER NACHWEIS DER APOPTOSEINDUKTION NACH EXPOSITION MIT BCG MITTELS RASTERELEKTRONENMIKROSKOPIE	77
3.8	NACHWEIS EINER TOXINSYNTHESE VON S4-JENA UND TICE MITTELS POLYKETIDANALYSE.....	79
3.8.1	MESSUNG VON POLYKETIDEN IN S4-JENA UND TICE MITTELS HSQC NMR	79
3.8.2	MESSUNG DER POLYKETIDKONZENTRATION IN DEN T24 UND CAL29 ZELLEN NACH EXPOSITION MIT S4-JENA UND TICE MITTELS HPLC-MS.....	81
3.8.3	MESSUNG DER POLYKETIDKONZENTRATION VON S4-JENA UND TICE NACH INKUBATION IN PROBANDENURIN MITTELS HPLC-MS	83
4	<u>DISKUSSION.....</u>	<u>84</u>
4.1	CHARAKTERISIERUNG DES S4-JENA STAMMES IM VERGLEICH MIT DEN KOMMERZIELL ERHÄLTlichen BCG STÄMMEN	84
4.2	FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG DES S4-JENA STAMMES IN BEZUG AUF SEIN THERAPEUTISCHES POTENTIAL.....	85
4.2.1	ADHÄRENZ UND INTERNALISIERUNG.....	87
4.2.2	PROLIFERATION	89
4.2.3	ZELLZYKLUSHEMMUNG/ APOPTOSE	90
4.3	MOLEKULARE PROGNOSEFAKTOREN	92
4.4	MYCOLACTONNACHWEIS.....	98
4.5	THERAPEUTISCHE PERSPEKTIVE DES BCG STAMMES S4-JENA	100
4.6	AUSBLICK	101
5	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>102</u>

ABSTRACT	104
LITERATUR	106
6 ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	117
7 TABELLENVERZEICHNIS.....	120
8 ANHANG.....	121
8.1 TNM KLASSIFIKATION	121
8.2 MATERIAL	123
8.2.1 GERÄTE.....	123
8.2.2 CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN.....	123
8.2.3 VERBRAUCHSMATERIALIEN	124
8.2.4 PUFFER UND LÖSUNGEN	124
8.2.5 ENZYME	125
8.2.6 ANTIKÖRPER	126
8.2.7 KOMMERZIELL ERHÄLTICHE KITS.....	126
8.2.8 LSM FARBSTOFFE	126
8.2.9 SOFTWARE	126
WISSENSCHAFTLICHE BEITRÄGE UND VERÖFFENTLICHUNGEN	127
DANKSAGUNG.....	128
LEBENS LAUF	129

Abkürzungsverzeichnis

5-ALA	5-Aminolävulinsäure
APS	Ammoniumpersulfat
BAK	BCG-aktivierte Killerzellen
BU	Buruli Ulkus
bzw.	Beziehungsweise
CdK	Zyklin-abhängige Kinasen
CFU	Colony forming units
CIS	Carcinoma in situ
DAPI	4'6-Diamidin-2-Phenyl-Indol
DNA	Desoxyribonucleic acid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EORTC	European Organization for Research and Treatment of Cancer
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
kDa	Kilodalton
LSM	Laser Scanning Mikroskop
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
FKS	Fetales Kälber Serum
FAB	Fibronectin attachment protein
h	Stunde
HMGB1	High Molecular Group Box Protein 1
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
HYAL1	Hyaluronglukosaminidase
IL	Interleukin
LAK	lymphokinaktivierte Killerzellen
LSM	Laser Scanning Mikroskop
medac	Medac-Company of Clinical Special Drug mbH
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minute
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse/Ladung
NMIBC	non-muscle invasive bladder cancer
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
PBS	Phosphat Buffered Saline
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
PS	Phosphatidylserin
s	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TNM	Tumor Nodes Metastasen
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TUR	Transurethrale Resektion
U	unit
ü.N.	über Nacht
V	Volt
Vol	Volumen
WHO	World Health Organisation
ZIMET	Zentralinstitut für Mikrobiologie und Experimentelle Therapie

1 Einleitung

Karzinomerkrankungen werden nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) im Jahr 2010 weltweit mit 12 Mio. neuen Fällen jährlich ¹ die häufigsten Todesursachen sein. Gründe hierfür sind die stetig ansteigende Lebenserwartung der Bevölkerung, aber auch der zunehmende Tabakkonsum in Entwicklungsländern (www.who.int).

Nach Studien des Robert-Koch-Instituts, Berlin, gab es in Deutschland im Jahr 2004 insgesamt 436.500 Neuerkrankungen und 208.824 Todesfälle durch Karzinomerkrankungen. In der Urologie ist das Harnblasenkarzinom nach dem Prostatakarzinom der zweithäufigste Tumor ².

1.1 Das Harnblasenkarzinom

1.1.1 Epidemiologie und Inzidenz

In Deutschland erkranken jedes Jahr über 28.750 Menschen an einem Harnblasenkarzinom, weltweit sind es 335.000 Menschen ^{3,4}. Im weltweiten Vergleich steht es auf Platz 7. der Häufigkeitsskala von Karzinomerkrankungen. Männer sind dabei knapp viermal so häufig betroffen wie Frauen. In Deutschland sterben annähernd 6.000 Patienten jährlich an den Folgen eines Harnblasenkarzinoms. Das mittlere Erkrankungsalter liegt für Frauen bei 74 Jahren und für Männer bei 71 Jahren. Damit zählen die Harnblasenkarzinome zu den Erkrankungen mit einem relativ hohen mittleren Erkrankungsalter. Eine gute Prognose, bezogen auf die 5-Jahres-Überlebensrate, zeigen die nichtinvasiven und gut bis mäßig differenzierten Karzinome. Die durchschnittliche relative 5-Jahres-Überlebensrate für Frauen liegt bei 70 % und für Männer bei 76 %. Betrachtet man nur die invasiven Karzinome der Harnblase, sinken die relativen 5-Jahres-Überlebensraten deutlich ab. Ist bereits eine Absiedlung des invasiven Karzinoms in Lymphknoten eingetreten, bestehen nur noch geringe Aussichten auf Heilung. Bis zu 25 % der Patienten erleiden einen Progress im Sinne eines höheren Karzinomstadiums bzw. schlechteren Differenzierungsgrades im Rezidiv ^{5,6}. Die Beurteilung des Therapieerfolges kann zumeist bereits im ersten Jahr nach der operativen Entfernung des Karzinoms getroffen werden ⁷.

1.1.2 Ätiologie

Es ist in der Medizin seit langem bekannt, dass chemische Kanzerogene eine negative Wirkung auf das Übergangsepithel der Harnblase besitzen. Als wahrscheinlichste Ursache für die Harnblasenkarzinomentstehung gelten exogene Noxen wie Rauchen und berufsbegleitende Belastungen mit aromatischen Aminen. Des Weiteren scheint ebenfalls die ethnische Herkunft im Zusammenhang mit der Ausbreitung des Harnblasenkarzinoms zu stehen. So ist das Erkrankungsrisiko für Afroamerikaner und Amerikaner lateinamerikanischer Abstammung im Vergleich zur Bevölkerung eurasischer Herkunft nur halb so hoch ^{8,9}.

Tabakrauch: Tabakrauch und das darin enthaltene 2-Naphtylamin gilt, besonders in den Industrieländern, als der Hauptfaktor für die Entstehung des Harnblasenkarzinoms ¹⁰. Das Risiko, an einem Harnblasenkarzinom zu erkranken, steigt bei Rauchern um das 2-4fache an ¹¹. Bei Passivrauchern liegt das Risiko bei 18 % für Frauen und 32 % für Männer ^{12,13}. Epidemiologische Studien haben gezeigt, dass es einen linearen Zusammenhang zwischen Intensität und Dauer des Tabakkonsums und dem Risiko an einem Harnblasenkarzinom zu erkranken gibt ¹⁴. Erst nach schätzungsweise 15 Jahren Tabakverzicht tendiert das Erkrankungsrisiko wieder auf das Niveau von Nichtrauchern ¹⁵.

Berufsbedingte Expositionen: Verschiedene Berufsgruppen haben ein erhöhtes Risiko an einem Karzinom der Harnblasen zu erkranken. Es konnte nachgewiesen werden, dass über 25 % der Harnblasenkarzinome auf den Kontakt mit berufsbedingten Kanzerogenen zurückzuführen sind ¹⁵. Dazu gehören unter anderem Schadstoffexpositionen in Gummi-Fabriken, in der Farben-, Leder- und Aluminium-Industrie sowie das Arbeiten mit aromatischen Aminen ^{11,16,17}.

Medikamente: Therapien mit Zytostatika wie Cyclophosphamid ¹⁸, Analgetika wie Phenazetin ¹⁹ und Chlornaphazin ²⁰ sowie Strahlungstherapien können ebenfalls für die Entstehung von Harnblasenkarzinomen verantwortlich sein ²¹. Nach einer Cyclophosphamid-Behandlung haben Patienten ein 9fach erhöhtes Risiko, ein Harnblasenkarzinom durch eine symptomatische oder asymptomatische chemische Zystitis zu entwickeln ²².

Bilharziose/ Zystitis: In bestimmten Teilen Afrikas, besonders in Ägypten, ist das Harnblasenkarzinom auf eine Bilharziose zurückzuführen. Diese wird durch den Pärchenegel *Schistosoma haemophilium* ²³ hervorgerufen, dessen Eier durch die Harnblasenwand wandern können. Chronische Harnwegsinfektionen mit ureasebildenden Bakterien, Harnblasensteine ²⁴ oder der Reiz durch intraluminale Dauerkatheter können ebenfalls zu einem erhöhten Karzinomrisiko führen ^{25,26}.

1.1.3 Pathogenese und Histologie/-TNM Klassifikation nach Einteilung der WHO 2004

Bei bösartigen Neubildungen der Harnblase handelt es sich bei ca. 95 % um Urothelkarzinome (Urothelial Cell Carcinoma, UCC)²⁷. Sehr viel seltener sind Plattenepithelkarzinome oder Adenokarzinome zu finden²⁸. Flache Wachstumsformen werden von papillären unterschieden. Bei Erstdiagnose sind ca. 80 % der Karzinome nicht muskelinvasiv²⁷. Im Jahre 2004 wurde die Klassifikation des Urothelkarzinoms vom dreistufigen Gradingssystem der WHO von 1973 durch ein zweistufiges System ersetzt (WHO 2004). Dadurch wurde die Klassifikation besser an aktuelle molekulargenetische und klinische Beobachtungen angepasst. Statt bisher in Grad 1 bis Grad 3 zu unterteilen, werden die Karzinome in „*Low-grade*“ und „*High-grade*“ unterschieden. Bei der *Low-grade*-Gruppe handelt es sich um genetisch stabile Karzinome, darunter sind die G1 sowie ein Teil der G2-Karzinome zu finden. Die *High-grade*-Gruppe umfasst genetisch instabile Karzinome, die den größten Teil der G2 sowie G3 Karzinome ausmachen. Die nicht-muskelinvasiven *High-grade*-Karzinome sind durch ihr überwiegend ungeordnetes morphologisches Erscheinungsbild charakterisiert. Mit deutlichen Veränderungen in der Histoarchitektur und einem Spektrum an atypischer Zytologie lässt sich die Grenze zu den *Low-grade*-Karzinomen ziehen²⁹. Die Unterscheidung des 2-Gradingsystems basiert auf dem histologischen Bild sowie auf genetischen Analysen und immunhistologischen Untersuchungen^{30,31}.

Mit der neuen WHO-Klassifikation (2004) findet der Begriff „oberflächliches Harnblasenkarzinom“ keine Verwendung mehr. Es werden erstmalig nicht-muskelinvasive (NMIBC) und muskelinvasive Harnblasenkarzinome unterschieden. Die Unterscheidung der Karzinomausbreitung wird nach TNM (TumorNodesMetastasen), wie in Tabelle 8 dargestellt, eingeteilt (Anhang; Tabelle 8, Abbildung 54).

1.1.4 Diagnostik

Die Diagnose eines Harnblasenkarzinoms hängt von vielen unterschiedlichen Faktoren ab. Als erste Symptome werden häufig Makrohämaturien, die oft schmerzlos verlaufen, und Harnwegsinfekte diagnostiziert. Selten kommt es zu kolikartigen Schmerzen, die durch Blutkoagel hervorgerufen werden können. Weiterhin kann es zu unnormalem Miktionsverhalten, Dysurie oder Pollakisurie kommen³². Bisher wird zum Nachweis eines Harnblasenkarzinoms eine Kombination aus Zystoskopie und Urinzytologie benötigt.

Dadurch gehört die Detektion des Harnblasenkarzinoms zu den teuersten Protokollen ³³. Bei der zytologischen Untersuchung wird zur Abklärung der Symptome Nativurin mittels Urinteststreifen und Mikroskopie auf pathologische Bestandteile hin untersucht. Bei der pathologischen Untersuchung des Urins sind selten Karzinomzellen zu finden, jedoch ist dies kein Beweis gegen das Vorliegen eines Harnblasenkarzinoms. Eine Vielzahl von Harnblasenkarzinomen kann durch ein Hämaturie-Screening entdeckt werden. Dabei schwanken die Zahlen der Sensitivität jedoch je nach Studie zwischen 46 % - 95 % ³⁴.

1.1.5 Molekulare Marker

Eine Kombination aus hoch sensitiven und nichtinvasiven Harnblasenkarzinommarkern könnte die Kosten für die Diagnostik senken und die Prognose der Patienten deutlich verbessern. Die Entwicklung für molekulare Marker des Harnblasenkarzinoms hat sich in den letzten Jahren signifikant weiterentwickelt. Viele verfügbare Marker sind geeignet, aber sie erfüllen bis jetzt nicht die Erwartungen von Ärzten und Patienten ³⁵.

Der UroVysionTest, ein Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierungs Test für chromosomale Veränderungen der Zellen im Urin, ist sensitiver als die Zytologie (69 % versus 38 %), jedoch ist die Spezifität gering ³⁶. Der BTA-Stat/TRAK Test ist ein Antigen Nachweis, der CFH (Complement Factor H) und CFHR (Complement Factor H-Related) Proteine im Urin misst. Die Sensitivität dieses Tests fällt mit 8 % - 89 % bei *Low-grade*-Karzinomen und kleinen Tumoren gering aus ^{37,38}. Die Spezifität reicht von 50 % - 70 % ³⁹. Eine vorherige Therapie mit BCG kann zu falsch positiven Ergebnissen führen ⁴⁰. Ähnliche Ergebnisse werden mit der Messung des zellulären Matrixproteins NMP22 (Nuclear Matrix Protein 22) erzielt ⁴¹. Sie hat eine gute Sensitivität zur Entdeckung von *High-grade*-Karzinomen, aber eine schlechte Sensitivität bei der Entdeckung von *Low-grade*-Karzinomen ⁴². Die Detektion von NMP22 wird mit einer Sensitivität von 47 % - 100 % und einer Spezifität von 60 % - 80 % angegeben ^{39,43}. Die Kombination aus Zystoskopie und NMP22 Test erreicht eine Sensitivität von 99 % ⁴¹.

Um eine Aussage über die Progression und das Patientenüberleben treffen zu können, werden verschiedene Tests angewendet. Der Nachweis von HYAL1 (Hyaluron Glukosaminidase) kann laut einer Studie die Progression des Karzinoms mit 81 % Sensitivität und 70 % Spezifität voraussagen ⁴⁴. Ein hoher Level im Urin der Patienten korreliert mit einer schlechten Prognose und der Progression des Karzinoms ⁴⁵. Einen wichtigen Harnblasenkarzinommarker stellt das Gen für Survivin dar. Es wird nicht in

normalem urothelialen Gewebe exprimiert ⁴⁶. Der Nachweis eines erhöhten Survivin-Levels wird mit einem aggressiven Karzinomverlauf, einer hohen Rezidivrate und einer hohen krankheitsspezifischen Mortalität in Verbindung gebracht ⁴⁶⁻⁴⁹. Neueste Diagnoseansätze, wie die Untersuchung von molekularbiologischen und molekulargenetischen Parametern (p53, M344, MIB-1, Ki67, E-Cadherin, Mikrosatellitenanalyse, spezifische Chromosomenveränderungen, etc.), werden zurzeit in klinischen Studien validiert ⁵⁰⁻⁵³.

Ein weiteres Ziel in der Therapie des NMIBC ist eine Gensignatur zu erhalten, die ein mögliches Ansprechen oder Versagen der verschiedenen Therapieoptionen voraussagt. Erste Ansätze dazu sind beschrieben worden ⁵⁴. Eine weitere Studie erstellte, basierend auf Markern, die in der Resistenz von Chemotherapie eine Rolle spielen, molekulare Profile der Patienten. Dadurch konnte gezeigt werden, welche Patienten Responder oder Nonresponder auf die verschiedenen Therapieoptionen sind ⁵⁵. Damit kann schon vor Therapiebeginn eine Abschätzung des Therapieerfolges vorgenommen werden.

1.2 Therapie des NMIBC

Die Therapie des NMIBC besteht zunächst in der transurethralen Resektion (TUR). Die weitere Behandlung orientiert sich am Karzinomstadium. Primäre monofokale NMIBC mit einer niedrigen Rezidiv- und Progressionswahrscheinlichkeit bedürfen keiner adjuvanten Therapie. Bei allen anderen NMIBC wird eine intravesikale Rezidivprophylaxe empfohlen. Hierbei haben sich die risikoadaptierte Therapie mit Zytostatika (Doxorubicin, Thiothepa, Mitomycin-C) oder immunmodulatorischen Agenzien wie BCG und Interferon- α 2b als derzeit gängige Therapieschemen etabliert ^{56,57}. Seit einiger Zeit wird die photodynamische Therapie als mögliche Zweitoption nach fehlgeschlagener BCG Therapie bei CIS (Carcinoma In Situ) oder UCC diskutiert ⁵⁸⁻⁶⁰.

1.2.1 Photodynamische Therapie (PDT)

Bei der Photodynamischen Therapie werden Photosensitizer zur Therapie des NMIBC verwendet. Sie wird besonders bei der therapierefraktären CIS als Therapieoption angewendet. Bei der PDT werden photosensitivierende Substanzen verwendet, die durch Lichtaktivierung in der Anwesenheit von Sauerstoff zum lokalen Zelltod führen. Diese Photosensitizer werden verstärkt im Karzinomgewebe angereichert. Der Grund für die Karzinomselektivität wird mit einem höheren Zellmetabolismus, mit erhöhtem Porphyrin-

Turnover und einem verminderten Abbau angegeben. Es werden Ansprechraten mit medianer kompletter Response von ca. 50 % und 80 % bei zuvor therapieresistenten CIS erreicht ⁶¹. Jedoch sind die Nebenwirkungen erheblich. Nach der PDT kann es zu Harnblasenschädigung mit konsekutiver Schrumpfung und fibrotisch bedingter permanenter Harnblasenkontraktion kommen ⁶².

1.2.2 Intravesikale Chemotherapie am Beispiel Doxorubicin

Doxorubicin ist pharmakologisch ein Zytostatikum und gehört chemisch in die Gruppe der Anthrazykline. Es wird als Chemotherapeutikum gegen verschiedene Karzinomarten, unter anderem auch beim NMIBC, eingesetzt ⁶³. Es interkaliert in die DNA ⁶⁴ und hemmt damit die Nukleinsäuresynthese und die Zellteilung. Doxorubicin inhibiert speziell die Topoisomerase IIa, ein Enzym der DNA-Synthese ⁶⁵. Es kommt dadurch zu irregulären DNA-Brüchen und spontanen zellschädigenden Vernetzungen. Dies ist für Zellen mit hoher Teilungsrate zytotoxisch. Durch diese Eigenschaften ist Doxorubicin eine toxische Substanz für Patienten, da sie auch gesunde Zellen angreift. Bei einer Behandlung mit Doxorubicin kann es zu einer Reihe von unerwünschten Nebenwirkungen kommen (Übelkeit und Anämie sowie verschiedene Organschäden, Knochenmarksdepression oder Herzschiädigung) ⁶⁶. Außerdem ist Doxorubicin mutagen und teratogen ⁶⁷, was zu Erbgut- und Fruchtschiädigungen führen kann.

1.2.3 *Mykobakterium bovis* ssp. *Bacillus-Calmette-Guérin* (BCG)

Laut den Leitlinien der European Association of Urology (EAU) sollen Patienten mit *High-grade* NMIBC (hohe Progressions-Wahrscheinlichkeit, multiple T1G2, Ta-T1G3 mit/ohne CIS oder CIS allein) eine adjuvante Behandlung mit dem *Mykobakterium bovis* ssp. *Bacillus-Calmette-Guérin* (BCG) als Erhaltungstherapie über mindestens ein Jahr erhalten ⁵⁶. Zirka 65 % bis 70 % der Patienten mit CIS sind als Responder auf die BCG Therapie anzusehen ^{63,68-70}. Das Risiko unbehandelter Patienten mit CIS, an einem muskelinvasiven Harnblasenkarzinom zu erkranken, liegt bei 80 % mit einer 60 %igen Mortalitätsrate ⁷¹. Eine randomisierte Studie zeigte, dass die Behandlung eines CIS mit Doxorubicin nur 34 % Responder aufwies vs. 70 % BCG Responder. Die 5-Jahres-Überlebensrate wurde mit 18 % bei Behandlung mit Doxorubicin vs. 45 % BCG Behandlung angegeben ⁶³.

Jedoch weisen etwa $\frac{1}{3}$ der Karzinome nach der lokalen BCG-Therapie eine Progression auf. Allerdings kann bei mehr als $\frac{1}{3}$ der Patienten, die auf die BCG-Therapie mit einer Karzinomregression reagieren, die Zystektomie vermieden werden ⁷². Eine 10-Jahresstudie zeigte, dass die Überlebensrate der Patienten nach Behandlung mit BCG 87 % betrug. Davon waren 67 % progressionsfrei ⁷³. Eine aktuelle 5-Jahresstudie der European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) zeigte deutlich, dass sowohl Patienten mit *High-grade*-Karzinomen als auch Patienten mit intermediären Karzinomen von der BCG-Therapie profitieren ⁷⁴.

Laut einer aktuellen Versorgungsstudie besteht eine deutliche Diskrepanz zwischen den Empfehlungen der Leitlinie und der Praxis ⁷⁵. Die adjuvante Therapie mit BCG wurde nur bei weniger als $\frac{1}{4}$ der Patienten mit entsprechend klarer Indikation (*High-grade* und CIS) durchgeführt. Trotz erfolgreicher Ergebnisse in den USA entscheidet sich eine Vielzahl von Ärzten in Deutschland nach erfolgter TUR für eine Weiterbehandlung mit Zytostatika, da die Wirkweise der BCG auf die Karzinomzellen nach wie vor ein ungeklärtes Phänomen ist.

So ist jedoch eine Vorhersage des Therapieansprechens für den individuellen Patienten noch nicht möglich, da trotz vielfältiger klinischer Studien keine unabhängigen Prognosefaktoren identifiziert werden konnten. Wesentlich für die individuelle Prognose des Patienten ist die Aussage, ob dessen NMIBC auf eine Therapie mit BCG anspricht oder nicht. Angesichts der möglichen Nebenwirkungen und Folgen einer BCG Instillation, wie z.B. Miliartuberkulose, Sepsis und Endophthalmitis, sollte eine solche Untersuchung jedoch nicht *in vivo* am Patienten, sondern *ex vivo* an isolierten Karzinomzellen durchgeführt werden ⁷⁶. Erste Untersuchungen solcher *in vitro* Tests wurden bereits angewendet und zeigten gute Ergebnisse ⁷⁷. Ausgangspunkt solcher patientenbezogener *ex vivo* Untersuchungen muss jedoch eine ausreichende Kenntnis über die Mechanismen der BCG Therapie sein. Bislang wurde der Wirkmechanismus dieser Therapieform vorwiegend über immunmodulatorische Effekte erklärt. Im Gegensatz zu anderen mukosalen Oberflächen, welche normalerweise mit Bakterien kolonisiert sind, ist die Harnblase grundsätzlich ein steriles Organ ⁷⁸. Mehrere Studien schlugen vor, dass BCG die zytotoxische Aktivität von Makrophagen gegen Harnblasenkarzinomzellen induziert und dass die Th1 Zytokine eine wichtige Rolle in der BCG-induzierten Makrophagentoxizität spielen ⁷⁹. So kommt es zu einer vermehrten Ausschüttung von Zytokinen in den Urin sowie in das Harnblasengewebe, was jedoch von Patient zu Patient erheblich variiert.

Durch diese großen Abweichungen erscheint die Verwendung von Urinzytokinen als prognostischer Marker nicht sinnvoll.

In Analogie zu den lymphokinaktivierten Killerzellen (LAK-Zellen) wurden in *in vivo* Untersuchungen so genannte BCG-aktivierte Killerzellen (BAK-Zellen) beschrieben. Diese sollen in der Lage sein, Harnblasenkarzinomzellen *in vitro* zu töten. Die Induktion dieser BAK-Zellen erfolgte über eine Stimulation mononukleärer Zellen durch BCG, wobei deutliche Unterschiede zur LAK-Induktion durch IL-2 bestehen sollen ⁸⁰. Immunmodulatorisch ausgerichtete Hypothesen verstehen die Harnblasenkarzinomzellen mehr als passive Zuschauer der Immunantwort gegenüber BCG. Dies erklärt jedoch nicht den nachweislichen Vorteil der lokalen BCG-Instillation gegenüber der unwirksamen systemischen Immuntherapie mit BCG. In jüngerer Zeit mehren sich in diesem Zusammenhang die Hinweise, dass die Karzinomzellen selbst in vielerlei Hinsicht aktiv in den BCG-vermittelten Wirkmechanismus involviert sind. So bindet ein 50 kDa großes Protein von BCG an die Kollagen-bindende Region von Fibronektin. Es konnte gezeigt werden, dass murine Harnblasenkarzinomzellen zur Antigenpräsentation gegenüber BCG-spezifischen CD4⁺-T-Zellen fähig sind ⁸¹. Die Expression von Oberflächenantigenen (MHC-Klasse-II, CD1, CD80 und ICAM-1), die für die Antigenpräsentation entscheidend sind, wird durch BCG direkt und nicht über einen indirekten Immuneffekt verstärkt ⁸². Darüber hinaus führt die Interaktion zwischen Karzinomzellen und BCG bei hochdifferenzierten im Gegensatz zu niedrigdifferenzierten Karzinomzelllinien zu einer verstärkten ICAM-1 Expression ⁸³. Die Wirksamkeit der BCG-Therapie scheint ebenfalls vom Differenzierungsgrad der Karzinomzellen abhängig zu sein. Auch andere proinflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren scheinen am Untergang von Harnblasenkarzinomzellen nach einer BCG-Therapie beteiligt zu sein. In BCG-Responder Karzinomzellen steigt die Expression von IL-6, IL-8, TNF- α und GM-CSF signifikant an, wobei sich wiederum eine Abhängigkeit der BCG-vermittelten Zytokinbildung vom Differenzierungsgrad der Karzinomzellen zeigte. Höher differenzierte Zellen sind zur Internalisierung von BCG weniger in der Lage und exprimieren auch weniger IL-6, wohingegen niedrigdifferenzierte Zellen BCG gut internalisieren und viel IL-6 exprimieren. Diese stressinduzierte IL-6-Expression wird als Teil des Wirkmechanismus der BCG-Therapie verstanden. Sie setzt jedoch die selektive Internalisierung der Mykobakterien durch die Karzinomzellen voraus. Ebenfalls weisen Patienten, welche mit BCG behandelt wurden, eine vermehrte Harnblasen-Stickstoffoxidproduktion und eine hochregulierte

Urothel-assoziierte Stickstoffoxidsyntheseproduktion auf ⁸⁴. Stickstoffoxid kann in hohen Konzentrationen der Grund für DNA Schäden und zytostatische sowie zytotoxische Effekte sein.

Insgesamt zeigen diese Daten, dass der BCG-vermittelte antikanzerogene Effekt nicht indirekt über die Beeinflussung des Immunsystems zu erklären ist. Sie unterstreichen die Notwendigkeit einer genaueren Charakterisierung des direkten Einflusses von BCG auf die Karzinomzellen.

1.3 BCG Stamm S4-Jena - Ein Überblick über die Geschichte und die große BCG-Familie

Die Therapie des NMIBC mit der Vakzine für Tuberkulose, *Mykobakterium bovis* ssp. Bacillus-Calmette-Guérin (BCG), geht auf Therapieversuche von Alvaro Morales zurück ⁸⁵. Im Jahre 1921 gelang es Albert Calmette und Camille Guérin am Institut Pasteur in Paris (Abbildung 1), nach 231 Passagen des *M. bovis* in Subkultur, einen attenuierten, nicht virulenten, aber in den Eigenschaften stabilen Stamm herzustellen.

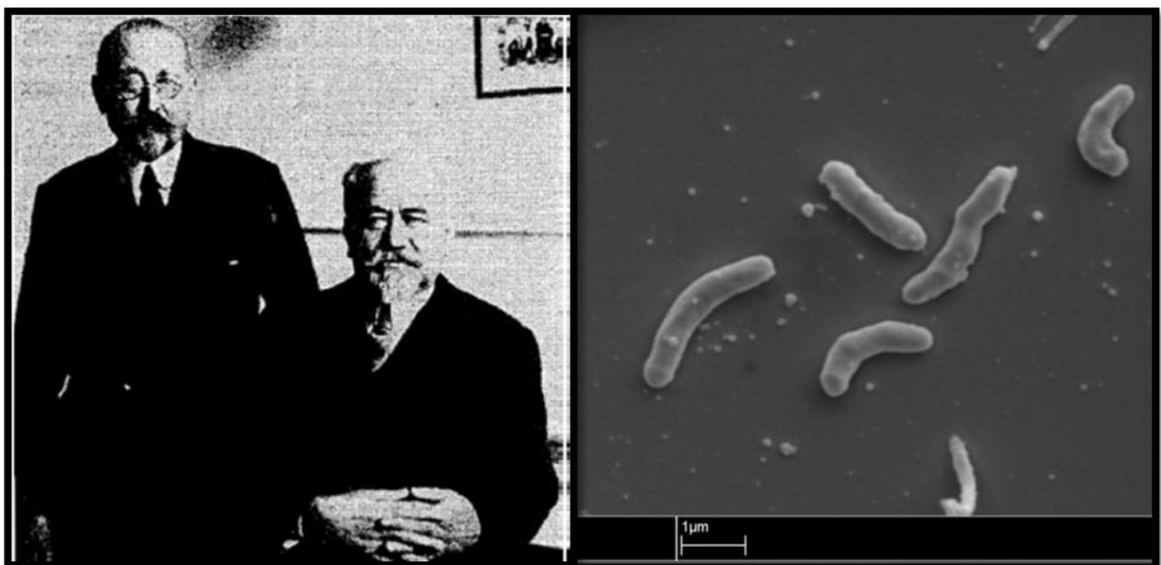


Abbildung 1: Camille Guérin (links) und Albert Calmette (1921) ⁸⁶, REM Aufnahmen der BCG des Stammes S4-Jena.

Bereits 1929 wurde anhand von Autopsiestudien eine geringere Frequenz von Karzinomen in Patienten mit Tuberkulose nachgewiesen ⁸⁷. Es wurde daraus geschlossen, dass es einen Zusammenhang zwischen Tuberkulose und Karzinomen gab. Dadurch wurden die Weichen für die Karzinomtherapie mit BCG gelegt. Eine weitere Studie zeigte 1959, dass Mäuse, welche mit BCG behandelt wurden, eine ansteigende Resistenz gegenüber transplantierten Karzinomen aufwiesen ⁸⁸. In den 70iger Jahren konnte gezeigt

werden, dass die intradermale Injektion von lebenden BCG in Meerschweinchen zu einer Regression der intradermalen Karzinome führte⁸⁹. Des Weiteren schützte sie vor Lymphknotenmetastasen und eliminierte nodale Mikrometastasen. Die klinische Karzinomtherapie mit BCG begann 1969 und 1970, als akute lymphoblastische Leukämie und als maligne Melanome intraläsional behandelt wurden^{90,91}. Weiterhin wurden Therapieansätze bei Lungen-, Prostata-, Darm- und Nierenkarzinomen untersucht, jedoch mit keinem zufrieden stellenden Ergebnis. Die systemische Behandlung mit BCG zur Steigerung der zellulären Abwehr hatte sich bei verschiedenen soliden Karzinomen nicht bewährt. Allein die lokale Therapie bei NMIBC zeigte positive Effekte. Basierend auf den Ergebnissen an Meerschweinchen und Hunden^{89,92} versuchte der Urologe Alvaro Morales BCG bei NMIBC des Menschen anzuwenden⁸⁵. Er instillierte eine Dosis von 120 mg BCG/ 50 ml Kochsalzlösung mittels eines Katheters in die Harnblase. Die BCG Therapie ist heute weltweit die Standardbehandlung von *High-grade* NMIBC. Jedoch ist bis heute nicht vollständig bekannt, wie BCG auf Karzinome wirkt.

1.3.1 S4-Jena BCG Historie

BCG wurde primär als Vakzine zum Schutz gegen Tuberkulose genutzt. Dafür wurden BCG-Stämme in der gesamten Welt gezüchtet. Im Jahre 1924 begann die Verteilung der BCG Vakzine in die verschiedensten Länder. Diese wurden dazu angehalten, den BCG Stamm nach den Protokollen von Calmette und Guérin weiter zu passagieren. Jedoch entwickelten sich über die Jahre daraus Tochterstämme, die kommerzialisiert wurden⁹³. In Deutschland sind für die Therapie des NMIBC drei BCG Stämme verfügbar. Dabei handelt es sich um die Stämme TICE, RIVM und Connaught. Genetische Untersuchungen zeigten, dass einzelnen Tochterstämmen über die Zeit eines der zwei IS6110 Gene⁹⁴ sowie das Gen *mpt64* verloren gegangen waren⁹⁵. Zu diesen Tochterstämmen gehören unter anderem die Stämme TICE und Connaught. Der RIVM Stamm wurde in diese Studien nicht mit einbezogen. Der Schweden Stamm, von dem S4-Jena BCG direkt abstammt, besitzt das *mpt64* Gen. Dagegen ist in allen BCG Stämmen ein Verlust der RD1 Region nachweisbar⁹⁶. Im Jahre 1934 transferierte Frederic Tice eine BCG Kultur von Frankreich in die USA. Dieser BCG-Stamm wurde TICE-BCG genannt und wurde an der Universität von Illinois (USA) weiter passagiert. In Deutschland wurde OncoTICE® (TICE BCG) im Jahre 1991 auf dem Markt eingeführt. Der RIVM-Stamm ist ein Tochterstamm vom Stamm 1173-P2 aus den Niederlanden. Seit 1993 wird der RIVM-Stamm durch die

Firma medac (Medac-company of clinical special drug mbH, Hamburg) vertrieben. Der Connaught-Stamm wurde 1937 von Paris nach Montreal und 1948 weiter nach Connaught (Willowdale, Canada) gebracht. Seit 1995 wird er unter dem Namen Immucyst® durch die Firma CytoChemia vertrieben.

1.3.2 BCG S4-Jena

Der BCG S4-Jena Stamm (Abbildung 1), der in dieser Studie verwendet wurde, kam 1926 von Paris nach Göteborg und wurde 1950 von Hans Knöll für die Tuberkulose Impfstoffproduktion nach Jena eingeführt. Die Produktion der Vakzine begann im Jahre 1952. Den Namen S4-Jena bekam der Stamm, da es der vierte Versuch von Hans Knöll war, den eingeführten BCG-Stamm zu etablieren. 1957 bekam die Vakzine die Akkreditierung als Flüssigvakzine und wurde von 1961 bis 1992 als lyophilisiertes Präparat vertrieben. Im Vergleich zu den anderen auf dem Markt etablierten BCG-Vakzinen zeigte der S4-Jena Stamm keine schweren Nebenwirkungen wie systemische Infektionen bei Neugeborenen⁹⁷. Im Jahre 1988 wurde durch Dr. Saalfeld, Urologe an der Medizinischen Akademie Erfurt, eine klinische Phase III-Studie mit der BCG Suspension des S4-Jena Stammes zur adjuvanten Therapie des NMIBC durchgeführt. An dieser Studie waren die Kliniken für Urologie in Erfurt, die Charité Berlin, die Universitätsklinik Dresden, die Kliniken von Aue, Frankfurt/Oder, Nordhausen sowie das St. Hedwig Klinikum in Berlin beteiligt. Erste Ergebnisse dieser multizentrischen Studie wurden auf dem 10ten Urologenkongress 1989 in Berlin präsentiert. Der BCG S4-Jena Stamm wurde daraufhin in Ostdeutschland am 16. Juli 1990 von der Arzneimittelbehörde in Berlin unter der Registrierungsnummer 10/01/103 als Immunstimulanz für das NMIBC zugelassen. Nach der Wiedervereinigung Deutschlands wurde das BCG-Institut ZIMET (Zentralinstitut für Mikrobiologie und Experimentelle Therapie) der DDR geschlossen und die Produktion des S4-Jena Stammes eingestellt.

Der S4-Jena Stamm ging mit der Gründung des Institutes für Experimentelle Mikrobiologie aus Teilen des ZIMET und dem Übergang dieses Institutes an die Medizinische Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena 1993 in den Besitz der Universität Jena über.

1.4 Karzinomentstehung

In gesunden Zellen besteht ein geregeltes Gleichgewicht zwischen Zellproliferation und Zelltod. Eine Schlüsselrolle bei der Karzinomentstehung ist eine Störung der Zellen, auf interne und/oder externe Signale reagieren zu können. Dabei kommt es zu einer schrittweisen Anhäufung von genetischen Mutationen⁹⁸. Die meisten karzinomrelevanten Genveränderungen unterscheiden sich von anderen genetischen Erkrankungen dadurch, dass sie nicht vererbt werden, sondern auf somatischen Mutationen beruhen. Die Regulation von Zellproliferation und Zelltod sind eng miteinander verbundene Signalwege, welche in der Karzinomentstehung eine wichtige Rolle spielen. In normalen, differenzierten Geweben besteht ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Zellproliferation und dem programmierten Zelltod (Apoptose). So kommt es bei Zellentartungen, die z.B. durch UV-Einstrahlung oder Kanzerogenen hervorgerufen wurden, durch Apoptose zu einer Eliminierung der geschädigten Zellen. Bei der Entstehung von benignen und malignen Karzinomen spielen beide Signalwege eine entscheidende Rolle. Alle malignen Karzinome weisen Störungen der Proliferations- und der Zelltodkontrolle auf. So kommt es sowohl zu einer ungehemmten Aktivierung von Zellzyklus-aktivierenden Signalwegen, aber auch zu einer Inaktivierung von Apoptose-relevanten Signalwegen. Maligne Karzinome zeigen häufig eine genetische Instabilität und akkumulieren weitere sekundäre genetische Veränderungen.

Fast alle nicht-chirurgischen Karzinomtherapien basieren auf dem Prinzip der Apoptose-Induktion oder des Zellzyklusarrestes. Dies führt zu einem Absterben der Karzinomzellen. Hierbei werden Faktoren aktiviert oder deaktiviert, welche den Zellzyklusarrest und/oder die Apoptose beeinflussen. Ein großes Problem der Chemo- oder Strahlentherapie ist, dass es durch die genetische Instabilität der Karzinome zu einem weiteren Verlust der Proliferationskontrolle und noch stärkerer Apoptoseresistenz kommt. Dies hat zur Folge, dass aggressivere und therapieresistentere Karzinome entstehen. Die Störungen von Apoptose- und Zellzyklussignalwegen sind nicht nur verantwortlich für die Karzinomentstehung, sondern auch für deren klinischen Verlauf.

1.4.1 Regulation des Zellzyklus

Eine modellhafte Beschreibung des Zellzyklus benennt einzelne Phasen zwischen zwei Zellteilungen. Er besteht aus den voneinander abgrenzbaren Phasen: G1-, S-, G2- und M-Phase. Unter physiologischen Bedingungen kann der Zellzyklus nicht an beliebiger Stelle angehalten werden, sondern nur an spezifischen „Checkpoints“⁹⁹. Ruhende Zellen (G0-Phase) treten in die G1-Phase ein, in der die Zellzyklusproteinsynthese und –aktivierung beginnt¹⁰⁰. Das Fortschreiten einer Zelle aus der G1-Phase in die S-Phase wird durch den G1/S-Checkpoint (Restriction Point) in der späten G1-Phase reguliert. Dieser Checkpoint kann nur überwunden werden, wenn bestimmte Voraussetzungen erfüllt sind¹⁰¹. Sind diese Voraussetzungen nicht erfüllt, kommt es zu einem Stadium der Quieszenz¹⁰². Dabei arretieren die Zellen in einem reversiblen Stadium. Dagegen ist die Seneszenz ein irreversibles Stadium, indem die seneszenten Zellen zwar metabolisch aktiv bleiben, jedoch nicht mehr in der Lage sind zu proliferieren. Kommt es zu Mutationen oder dem Verlust von Kontrollgenen, kann die Seneszenz durchbrochen werden und die betroffenen Zellen werden immortal¹⁰³. In Abwesenheit von Wachstumsfaktoren oder in Anwesenheit von Zellteilungsinhibitoren, wie z.B. TGF- β , kommt es zu einem Zellzyklusarrest in der G0/G1-Phase. Weitere Checkpoints sind G2/M und M/G1. Am G2/M-Checkpoint wird kontrolliert, ob das Genom vollständig repliziert wurde. Der M/G1-Checkpoint wird durch den Anaphase-Promoting-Komplex kontrolliert. Dabei wird eine gleichmäßige Verteilung der Chromosomen überprüft¹⁰⁴.

Liegen nicht alle Voraussetzungen für den Übertritt in die nächste Phase vor, kommt es zu Zellzyklusarrest und Reparatur oder zum programmierten Zelltod durch Apoptose. Sind diese Kontrollmechanismen z.B. durch die Deregulierung von Kontrollgenen in Karzinomzellen aufgehoben, kommt es zu einem unkontrollierten Zellwachstum. Zu den wichtigsten Kontrollgenen gehören die Zykline und die Zyklin-abhängigen Kinasen (CdK). Die Genexpression der Zykline ist in den einzelnen Phasen des Zellzyklus differentiell exprimiert. Die Zykline regulieren die Enzymaktivität der CdKs, welche durch die Phosphorylierung von Substratproteinen das Fortschreiten der Zellen im Zellzyklus regulieren¹⁰⁵. Am G1/S Checkpoint wird durch wachstumsstimulierende Signale die Transkription von D-Zyklinen und E-Zyklinen ausgelöst¹⁰⁶. Diese wiederum aktivieren CdK 4/6. Molekularanalysen zeigten, dass in einer Vielzahl von Karzinomen eine Überexpression von Zyklin D1 vorliegt, wodurch ein ungehemmtes Zellwachstum ausgelöst wird¹⁰⁷.

1.4.2 Regulation der Apoptose

Neben der Regulation des Zellzyklus stellt die Apoptose einen weiteren wichtigen Kontrollmechanismus der Zellen dar. Die Apoptose ist von einer Nekrose abzugrenzen, da es sich hierbei im Gegensatz zur Nekrose um einen aktiven, durch die Aktivierung der Apoptosekaskade initiierten Zelltod handelt. Sie ist für die Entwicklung und das Zellgleichgewicht von Organismen von zentraler Bedeutung. Beispielsweise führt die Apoptose in der Embryonalentwicklung zum Absterben der Zellen zwischen den einzelnen Fingern ¹⁰⁸. Sie fungiert ebenfalls als Schutzmechanismus bei entarteten oder stark geschädigten Zellen. Dabei werden betroffene Zellen aktiv abgetötet und deren Zellbestandteile vom Immunsystem aufgenommen und beseitigt ^{109,110}.

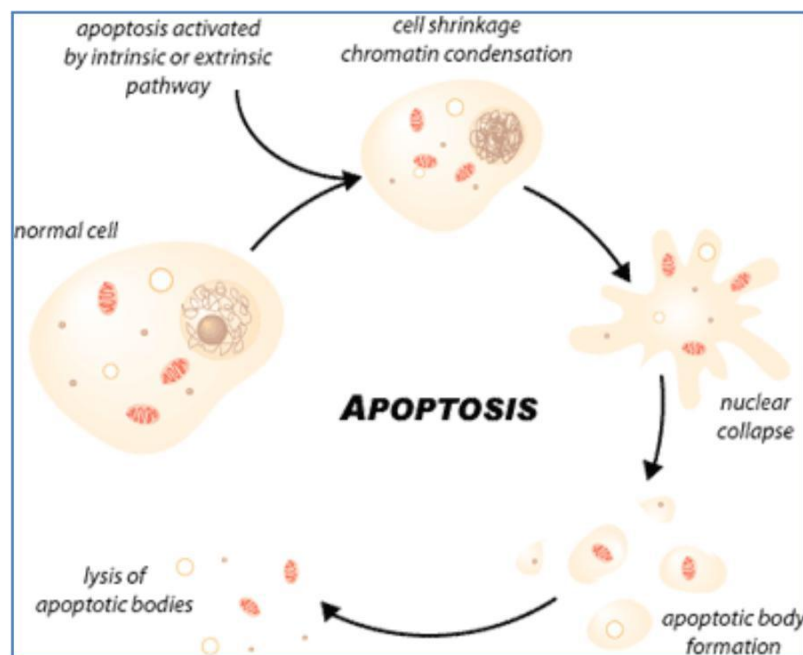


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Apoptose (modifiziert nach Yau ¹¹¹)

Die Apoptose ist ein energieabhängiger Prozess, der sich in drei morphologische Phasen unterteilen lässt ¹¹². Während der ersten Phase behalten die Zellen eine normale Morphologie. Auf zellulärer Ebene kann die Apoptose durch zwei verschiedene Kaskaden ausgelöst werden. Zum einen durch die Aktivierung der Todes-Rezeptoren (extrinsischer Pathway) oder die Aktivierung des mitochondrialen Weges (intrinsischer Pathway) ¹¹³. Die zweite Phase ist charakterisiert durch das Abschnüren der Plasmamembran, das sogenannte „blebbing“. In der dritten Phase kommt es zu einem aktiven kompletten blebbing der Zellen und die Zelle stirbt. Der gesamte Zellinhalt wird in „apoptotische Körperchen“ verpackt und dann in die Umgebung abgegeben. Anschließend werden diese

in Makrophagen aufgenommen. Dadurch wird vermieden, dass der Inhalt abgestorbener Zellen in das Gewebe freigesetzt wird, wodurch das Auftreten von Entzündungsprozessen unterbunden wird.

Neben den morphologischen Veränderungen der Zellen (Abbildung 2) sind verschiedene molekulare Mechanismen für die Induktion der Apoptose verantwortlich. Die molekularen Mechanismen der Apoptose sind durch die Aktivierung von Onkogenen und/oder Inaktivierung von Karzinomsuppressorgenen gestört. Zu diesen Apoptose Proteinen gehören u.a. die Familie der „Inhibitor of apoptosis“ (IAPs), die die Apoptose blockieren können. Zu der IAP-Familie gehören c-IAP1, c-IAP2, X-IAP und Survivin. Das für Survivin kodierende Gen spielt bei den molekularen Prognosefaktoren des Harnblasenkarzinoms eine wichtige Rolle.

1.5 Zielstellung der Arbeit

Die adjuvante Therapie des nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms mit dem *Mykobakterium bovis* ssp. Bacillus-Calmette-Guérin (BCG) ist weltweit Goldstandard bei *High-grade* Karzinomen. Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist der Wirkmechanismus dieser Behandlungsform nicht vollständig aufgeklärt. Einige Arbeiten postulieren, dass BCG in der Harnblase als „passiver Bystander“ der Immunantwort fungiert. In früheren Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass die BCG Exposition von Zellkulturen in Abwesenheit des Immunsystems zu einem Absterben der Karzinomzellen führt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde mit neuen Methoden die molekulare Ebene der BCG Therapie am Modell der Harnblasenkarzinomzelllinien untersucht werden. Dabei sollte geklärt werden wie die BCG mit den Zellen interagieren und welche Konsequenzen die Exposition mit BCG für die Zellen dabei hat. Die induzierten Veränderungen in den Karzinomzellen infolge einer BCG Exposition sollten mittels eines DNA-Microarrays bestimmt und die veränderten Gene hinsichtlich ihrer biologischen Funktion vergleichend analysiert werden. Parallel dazu wurden die funktionellen Gene untersucht.

Weiterhin wurden die Unterschiede zwischen den zwei BCG Stämmen untersucht. Dabei handelt es sich um den kommerziell für die Harnblasenkarzinomtherapie erhältlichen TICE Stamm und den in Jena für die Tuberkuloseimpfung bis 1990 gehaltenen S4-Jena Stamm.

Folgende Fragestellungen sollten beantwortet werden:

1. Welche molekularen Mechanismen werden in den Karzinomzellen nach Exposition mit BCG aktiviert?
2. Können Zelllinien als Responder/Nonresponder zur BCG Therapie identifiziert werden und wie?
3. Gibt es einen Unterschied zwischen dem S4-Jena Stamm und dem kommerziell erhältlichen TICE Stamm?

2 Methoden

2.1 Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) erworben. Es handelt sich hierbei um die humanen Harnblasenkarzinomzelllinien T24 (ACC 376) und Cal29 (ACC 515), die adhärent wachsen. Beide Zelllinien wurden im kryokonservierten Zustand geliefert und für die Versuche aufgetaut und kultiviert.

2.1.1 Kulturbedingungen der Zelllinien

Als Kulturmedium für die Harnblasenkarzinomzelllinien T24 und Cal29 wurde Dulbecco's Modified medium (DMEM) verwendet, welches mit 10 % hitzeinaktiviertem FKS (fetales Kälberserum) komplementiert wurde. Die Zellen kultivierten bei 37°C und 5 % CO₂. Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

2.1.2 Anzucht und Vermehrung der Zelllinien

Für die Passagierung der konfluent wachsenden Zelllinien wurde zunächst das Kulturmedium entfernt, die Zellen zweimalig mit 2% FKS/ PBS gespült und anschließend mit 0,1 % Trypsin im Brutschrank für 5 min abgelöst. Zum Abstoppen der enzymatischen Wirkung des Trypsins wurden die Zellen in 10 ml 2 % FKS/ PBS aufgenommen. Danach wurde die Zellsuspension zentrifugiert (3.000 g, 5 min) und das Zellpellet in 10 ml Kulturmedium (DMEM + 10 % FKS) resuspendiert. Nach der Zellzählung mittels Neubauer-Kammer wurden 1×10^6 Zellen pro 75 cm² Flasche in 10 ml Kulturmedium ausgesät. Nach zwei Tagen wurde das Kulturmedium gewechselt und die Zellen mit frischem Kulturmedium für die Versuche im Brutschrank weiter inkubiert.

2.1.3 Bestimmung der Zellzahl und Vitalitätsprüfung

Für die Kryokonservierung und Expositionsversuche war, um definierte Versuchsbedingungen zu schaffen, eine genaue Zellzahlbestimmung notwendig.

Zur Zellzahlbestimmung wurden die Zellen, wie in Kapitel 2.1.2 beschrieben, geerntet, in 5 ml Kulturmedium resuspendiert und in einer Neubauer-Kammer gezählt. Dafür wurden

100 µl der Zellsuspension mit 100 µl einer 0,5 % Trypanblaulösung für 5 min bei 37°C inkubiert und anschließend mit 800 µl PBS versetzt. Davon wurden 10 µl zwischen Deckglas und Zählkammer pipettiert und unter dem Lichtmikroskop 5 der 9 Großquadrate ausgezählt. Abgestorbene Zellen färbten sich durch Trypanblau blau. Die Berechnung der Zahl der vitalen Zellen (ungefärbt) in der Suspension erfolgte unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors sowie des Volumens der Suspension. Nach Zentrifugation der Zellsuspension wurde eine für die verschiedenen Experimente definierte Zelldichte für die Weiterkultivierung im Kulturmedium eingestellt.

2.1.4 Einfrieren und Auftauen der Zelllinien

Für die Kryokonservierung wurden die Zellen wie unter Kapitel 2.1.2 beschrieben geerntet. Nach Bestimmung der Zellzahl (Kapitel 2.1.3) wurden die Zellen zentrifugiert (3.000 rpm, 5 min) und das Zellpellet in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ ml in Gefriermedium resuspendiert. Für das Gefriermedium wurde dem Kulturmedium 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) zugegeben. Diese Zellsuspension wurde zu je 1 ml in Kryoröhrchen überführt und sofort bei – 80°C tiefgefroren, um die zytotoxische Wirkung von DMSO zu vermeiden. Nach 24 h wurden die Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff bei - 196°C überführt und für den weiteren Bedarf aufbewahrt.

Um die eingefrorenen Zellen wieder zu reaktivieren und die zytotoxische Wirkung des DMSO zu vermeiden, wurden die Zellen im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, in Kulturmedium aufgenommen und sofort zentrifugiert (3.000 g, 5 min). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit 5 ml 2 % FKS/ PBS gewaschen und wiederum zentrifugiert (3.000 g, 5 min). Das Zellpellet wurde in 10 ml des Kulturmediums aufgenommen und in eine 75 cm² Zellkulturflasche ausgesät.

2.1.5 Mycoplasmentest

Die Zelllinien wurden regelmäßig auf eine mögliche Mykoplasmenkontamination hin getestet. Dafür wurde parallel zu den Versuchen Zellen in einer Kulturflasche ausgesät. Die Testung auf Mykoplasmen erfolgte mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid). Dafür wurden die Zellen zweimal mit 2% FKS/ PBS gewaschen und mit 3 ml DAPI-Kulturmedium (Endkonzentration: 1µl DAPI / ml

Kulturmedium) versetzt. Die Auswertung einer etwaigen Mykoplasmenkontamination erfolgte am LSM (LaserScanningMikroskop, Kapitel 2.3.4, Anhang, Kapitel 8.2.8).

2.2 BCG-Stämme

Die verwendeten kommerziell erhältlichen BCG Stämme wurden direkt von den Firmen Medac (RIVM), Apogepha (TICE) und CytoChemia (Connaught) bezogen. Zur Weiterverarbeitung wurden die BCG in der mitgelieferten physiologischen NaCl-Lösung in einer Konzentration von 1×10^8 CFU/ml resuspendiert und direkt weiter verwendet. Der BCG Stamm S4-Jena wurde aus den lyophilisierten Impfstoffbeständen des ehemaligen ZIMET Institutes wieder erfolgreich angezüchtet. Die Anzucht erfolgte nach dem Originalprotokoll, welches von Calmette und Guérin im Jahre 1920 etabliert wurde ¹¹⁴.

2.2.1 Kultivierung des S4-Jena BCG Stammes

Der S4-Jena BCG Stamm wurde abwechselnd auf jeweils zwei Galle-Glyzerin-Kartoffeln und einer Glyzerin-Kartoffel in ROUX-Röhrchen angezüchtet und kontinuierlich alle zwei Wochen weiter passagiert. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C im Dunkeln. Nur Kartoffeln mit einem Stärkegehalt von > 16 % sind für dieses Anzuchtverfahren geeignet. Sowohl von den Glyzerin-Röhrchen als auch von den Galle-Glyzerin-Röhrchen wurde jeweils $\frac{1}{3}$ des Bakterienrasens in je zwei Glyzerin-Röhrchen und ein Galle-Glyzerin-Röhrchen überführt (Anhang, Abbildung 54). Die drei Teile des Bakterienrasens werden gut miteinander vermischt und auf den Kartoffelstücken verteilt.

Nach zweiwöchiger Inkubation bei 37°C bildete sich auf dem Glyzerin ein Häutchen, welches vorsichtig in Sautonmedium überführt wurde. Dabei war darauf zu achten, dass das Häutchen als Emerskultur an der Oberfläche erhalten blieb. Ungefähr zehn Tage später hatte sich die Bakteriendecke geschlossen und eine blumenkohlartige Struktur angenommen. Die erhaltene Bakterienmasse wurde abgepresst und die Trockenmasse gewogen. Anhand des Trockengewichtes wurden die Bakterien in einer Konzentration von 1×10^8 CFU/ ml in Laktose eingestellt (Formel: 60 mg Bakterienmasse entsprechen 1×10^8 BCG). Die Bakterienmasse wurde mit der Laktose versetzt und 3 min unter rühren mit Stahlkugeln homogenisiert. Für die spätere Verwendung wurde die Bakteriensuspension bei -20°C eingefroren.

Herstellung der Kartoffeln

Kartoffelstücke wurden in einem Durchmesser von ca. 2 cm und einer Länge von 5 cm ausgestanzt, in der Länge halbiert und die Seiten schräg abgeschnitten.

Für die Glyzerinkartoffeln wurden die Kartoffelstücken 2 h in eine 1 % Sodalösung bei RT belassen, danach zwischen Fließpapier getrocknet. Anschließend kamen die Kartoffelspalten für 48 h bei 4°C in 5 % Glycerinwasser. ROUX-Röhrchen wurden mit 10 ml 5 % Glycerinwasser gefüllt, die Kartoffelstücke mit der abgeschrägten Seite nach unten ins Röhrchen überführt, autoklaviert (30 min bei 120°C) und bei RT aufbewahrt.

Für die Galle-Glyzerin-Kartoffeln wurde Schweine- oder Rindergalle autoklaviert (30 min bei 120°C). Nachdem sich der Niederschlag abgesetzt hatte, wurde der Überstand über ein grobes Filterpapier filtriert. Die Galle wurde erneut autoklaviert und reifte mindestens drei Wochen bei 4°C. Die Kartoffelstücke wurden in Galle mit 5 % Glycerin für 2 h bei 75°C im Wasserbad erhitzt und anschließend in ROUX-Röhrchen mit je 10 ml 5 % Glyzeringalle gegeben. Nach dem Autoklavieren (30 min bei 120°C) konnten die Galle-Glyzerin-Röhrchen bis zu vier Wochen bei 4°C aufbewahrt werden.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Pulsfeldgelelektrophorese

Um die Anzahl der spezifischen genotypischen Unterschiede der einzelnen BCG Stämme zu charakterisieren, wurden Pulsfeldgelelektrophoresen (PFGE) durchgeführt. Dafür wurden jeweils 10 ml BCG Flüssigkultur (Konzentration 1×10^6 CFU/ ml) bei 5.000 g und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Bakterienpellet wurde in 400 µl TS-Puffer resuspendiert und mit 400 µl Agarose-TEN-Puffer versetzt. Anschließend wurde die erhaltene Bakteriensuspension in Blöckchen gegossen und bei 4°C zum Erstarren gebracht. Die gehärteten Agaroseblöcke wurden in 2 ml EC-Puffer aufgenommen und für 48 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Blöcke in 2 ml EC-Puffer mit 0,5 mg/ ml Proteinase K für 2 h inkubiert. Anschließend wurden die Blöcke in 2 ml TE-Puffer überführt und für 2 h bei 37°C geschüttelt. Die DNA wurde mit VspI (20 U/ ml) ü.N. bei 37 °C ü.N. verdaut. Die Blöcke mit der verdauten DNA wurden in die Vertiefungen eines 1 % Agarosegels (in 0,5fachen TBE-Puffer) überführt. Die PFGE Parameter waren: 22 h,

6 V/ cm, Pulszeit 1–40 s bei 15 °C. Das PFGE Gelmuster wurde mit 0,5 µg/ ml Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht abgebildet.

2.3.2 Proliferationsmessung mittels WST-1-Test (Roche)

Der WST-1-Test diente zur Bestimmung der Vitalität, indem die metabolische Aktivität der Zellen nach Exposition mit BCG gemessen wurde. Das chromogene Tetrazoliumsalz WST-1 wird durch mitochondriale Succinatdehydrogenasen lebender Zellen reduktiv aufgespalten. Es entsteht ein wasserlösliches Formazansalz. Durch Zunahme der Anzahl lebender Zellen kommt es zu einer Zunahme der aktiven mitochondrialen Dehydrogenase. Dadurch kommt es zu einer Zunahme der Menge an orangefarbenem wasserlöslichen Formazansalz. Dieses ist innerhalb vorgegebener Grenzen direkt proportional zur metabolischen Aktivität der Zellen in der Kultur. Der WST-1-Test ist ein etabliertes Verfahren um die Proliferation durch die spektrophotometrische Quantifizierung des Formazansalzes zu bestimmen.

Für die Proliferationsmessung der Zelllinien wurden je 100 µl Zellsuspension in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/ ml in 96 Mikrotiterplatten ausgesät und für 24 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Danach erfolgte die Exposition mit 10 µl 1×10^6 CFU/ ml BCG für 1 h, 4 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h und 96 h. Anschließend wurden 10 µl WST-1 zu jedem Ansatz pipettiert. Es folgte eine optimale Inkubationszeit von 1,5 h bei 37°C und 5 % CO₂, bevor die Bildung des orangefarbenen Formazansalzes bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenzwellenlänge 650 nm) in einem Spektrometer (ELISA-Reader) photometrisch gemessen wurde. Als Blindwerte wurden ebenfalls die Vitalität der BCG Stämme sowie von nicht BCG exponierten Kontrollzellen in den gleichen Zeitintervallen gemessen und in der Berechnung berücksichtigt.

2.3.3 Immunfluoreszenzmessung am Durchflusszytometer

Die Durchflusszytometrie stellt eine exakte Methode dar, eine hohe Anzahl von Zellen in einer Einzelzellsuspension in Bezug auf verschiedene zelluläre Parameter zu erfassen. Durch Behandlung mit fluoreszierenden Substanzen lassen sich antigene, biochemische oder biophysikalische Eigenschaften von Zellen oder auch Zellkernen quantifizieren. Durch die Durchflusszytometrie ist es möglich, verschiedene Wellenlängenbereiche

separat zu detektieren, was die parallele Anwendung verschiedener Fluorochrome erlaubt. Zum Beispiel sind die Fluoreszenzfarbstoffe an Antikörper gebunden, die gegen die zu untersuchenden Oberflächenantigene oder gegen intrazelluläre Antigene gerichtet sind. Es können ebenso die Zellmembran oder die DNA direkt mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden. Für alle diese Messungen gilt die Proportionalität zwischen dem Fluorochromgehalt und der Zelleigenschaft. Die markierten Zellen werden nach der Beladung mit einem Fluorochrom durch eine dünne Kapillare im Durchflusszytometer angesaugt und in einem Flüssigkeitsstrom durch einen Laserstrahl geführt. Dabei werden die Fluoreszenzfarbstoffe zur Emission von Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt. Nach Passage verschiedener Filter wird das Licht in Photodetektoren in einen elektrischen Impuls verwandelt, der mit der Intensität des Lichtsignals korreliert. Die aufgenommenen Signale werden an einen Computer zur weiteren Datenverarbeitung weitergegeben.

Die Messung der Proben erfolgte mit einem FACSCalibur und die Daten wurden mit Hilfe der Cellquest-Software (Becton-Dickinson, USA) ausgewertet. Als Ausgangswert wurde die mediane Fluoreszenzintensität der unbehandelten Kontrollzellen abzüglich der Hintergrundfluoreszenz der ungefärbten Kontrollgruppe bestimmt.

Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe waren:

<i>Fluoresceinisothiocyanat (FITC):</i>	<i>Anregung bei 488 nm / Emission bei 519 nm</i>
<i>Phycoerythrin (PE):</i>	<i>Anregung bei 488 nm / Emission bei 578 nm</i>
<i>Propidiumiodid (PI):</i>	<i>Anregung bei 488 nm / Emission bei 650 nm</i>

2.3.3.1 Präparation der Zellen für die Durchflusszytometrie

Für die Messungen am Durchflusszytometer wurden die Zellen in einer Konzentration von 1×10^5 CFU/ 3 ml Zellmedium in 6 well Platten ausgesät und 24 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Die adhärenenten Zellen wurden zweimal mit 2 % FKS/ PBS gewaschen und in 3 ml Kulturmedium aufgenommen. Danach wurden die Zellen mit 100 µl (1×10^8 CFU/ ml) BCG S4-Jena und TICE für 1 h, 4 h, 12 h und 24 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abtrypsiniert, zweimal mit 2 % FKS/ PBS gewaschen und nach entsprechenden Experimentprotokollen aufgearbeitet.

2.3.3.2 Zellzyklusanalyse mittels Nicoletti-Färbung

Für die Analyse des Zellzyklus nach Exposition mit lebenden und abgetöteten BCG wurden die Zellen wie in Kapitel 2.3.3.1 beschrieben behandelt. Nach den entsprechenden Zeitintervallen wurden die adhärennten Zellen zweimal mit 2 % FKS/ PBS gewaschen, abtrypsiniert, zentrifugiert (3.000 g, 5 min) und das Zellpellet in 2 ml eiskaltem 70 % Ethanol fixiert. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die so fixierten Zellen bei 4°C aufbewahrt. Für die Zellzyklusanalyse wurden die Zellen zweimal mit 2 % FKS/ PBS gewaschen, um das Ethanol von den Zellen zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen in 200 µl Pipes-PI-RNase-Puffer (Endkonzentration 10 µg/ ml PI, 20 u/ ml RNase) aufgenommen und für 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Die markierten Zellen wurden im Durchflusszytometer quantitativ gemessen.

2.3.3.3 Apoptosemessung mittels AnnexinV–FITC/Propidiumiodid Assay

Um zu Bestimmen ob die Zellschädigung durch die Exposition mit BCG auf Apoptose oder Nekrose beruht, wurde der AnnexinV–FITC/Propidiumiodid-Assay (BD Pharmingen™) verwendet. Annexin V bindet an Phosphatidylserin (PS), welches als frühes Ereignis während der Apoptose von der Innenseite der Zellmembran nach außen verlagert wird (PS-Flip). Die Zellmembran spätapoptotischer, nekrotischer oder toter Zellen wird aufgrund gesteigerter Permeabilität durchlässig für PI, so dass diese anhand einer erhöhten PI-Fluoreszenz detektiert werden können. Die Kombination beider Färbemethoden macht es möglich, apoptotische und nekrotische Zellen voneinander zu unterscheiden: frühapoptotische Zellen sind AnnexinV-positiv und PI-negativ. Zellen, die sich in einem späteren Stadium der Apoptose befinden, lassen sich sowohl mit AnnexinV als auch mit PI anfärben, während nekrotische Zellen nur mit PI anfärbbar sind.

Für den Apoptosenachweis wurden die Zellen, wie in Kapitel 2.3.3.1 beschrieben, ausgesät und für 1 h, 4 h, 12 h und 24 h mit BCG exponiert. Eine Apoptose der Zellen wurde mit dem AnnexinV-Apoptosis Detection Kit der Firma Abcam® nachgewiesen. Dabei wurde nach dem Protokoll des Herstellers verfahren. Anschließend wurden die Zellen am Durchflusszytometer (FL1-H =AnnexinV-FITC; FL2-H =Propidiumiodid) analysiert und quantifiziert.

2.3.3.4 *Nachweis der Internalisierung von BCG in Zellen*

Für den Versuch wurden die BCG mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) markiert. Dafür wurden die BCG in 1 ml FITC-Puffer (1 mg FITC/ 1 ml Internalisierungspuffer) für 30 min bei 20°C inkubiert und anschließend zentrifugiert (10.000 g, 15 min). Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 2 % FKS/ PBS resuspendiert und für 10 min bei 10.000 g zentrifugiert. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt. Die FITC markierten BCG wurden in einer Konzentration von 1×10^8 CFU/ ml im vorgewärmten Kulturmedium für die Exposition der Zellen aufgenommen.

Für den Internalisierungsversuch am Durchflusszytometer wurden die Zellen, wie in Kapitel 2.3.3.1 beschrieben, ausgesät und mit 100 µl FITC markierten BCG (Endkonzentration 1×10^8 CFU/ ml) exponiert. Nach den Inkubationszeiten von 1 h, 4 h, 12 h und 24 h wurden die adhärennten Zellen mit 2 % FKS/ PBS gewaschen, abtrypsiniert und in 10 ml 2 % FKS/ PBS aufgenommen. Die Zellen wurden nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (10.000 g, 5 min) mit 2 ml 2 % FKS/ TPBS für 5 min bei 4°C geblockt und anschließend abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Primärantikörper (Kaninchen-anti-BCG) resuspendiert und für 30 min bei 4°C inkubiert. Nach einem Waschschriff (2 % FKS/ PBS) wurden die Zellen mit dem Sekundärantikörper (Ziege-anti-Kaninchen/ PE markiert) für 30 min bei 4°C inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschriffen mit 2 % FKS/ PBS wurden die Zellen in 300 µl 0,5 % Paraformaldehyd für 5 min fixiert. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen in PBS aufgenommen und in 5 ml Probenröhrchen überführt. Anschließend erfolgte umgehend die durchflusszytometrische Analyse der Zellen (FL1-H = BCG-FITC; FL2-H = sekundärer AK/ PE markiert).

2.3.4 Immunfluoreszenz-Analyse am konfokalen Laser Scanning Mikroskop

Die konfokale Laser Scanning Mikroskopie (LSM) bietet durch die Erzeugung von digitalen Bilddaten die Möglichkeit einer Bildanalyse mit dem Computer. Dabei können drei-dimensionale Strukturen der Zellen wiedergegeben werden. In der vorliegenden Arbeit wurde das LSM 5 der Firma Zeiss verwendet. Dieses Mikroskop war mit drei Lasern verschiedener Anregungswellenlängen ausgestattet. Zum Einsatz kamen ein Argon-Laser (488 nm) und zwei Helium-Neon-Laser (543 nm, 633 nm).

Für die Immunfluoreszenzexperimente wurden 400 µl ($0,5 \times 10^5$ Zellen/ ml) in Kulturkammern mit Deckglasboden (Lab-Tek™ Chamber Slides) ausgesät und 24 h bei

37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Vor Versuchsbeginn wurden die adhärenz gewachsenen Zellen zweimal mit 2 % FKS/ PBS gewaschen und 400 µl Kulturmedium zugegeben. Die Zellen wurden mit 10 µl lebenden bzw. abgetöteten BCG TICE sowie S4-Jena Suspension (Endkonzentration 1 x 10⁵ CFU/ ml) für 24 h exponiert. Danach erfolgten zwei weitere Waschschrte mit 2 % FKS/ PBS und es konnte mit den entsprechenden Fluoreszenzexperimenten begonnen werden.

2.3.4.1 *Immunfluoreszenz-Färbung zum Apoptose Nachweis*

Die Apoptose der Zellen nach Exposition mit BCG wurde mit Hilfe des Magic Red™-DEVD Test über die Detektion der aktivierten Caspasen 3&7 in lebenden, intakten Zellen nachgewiesen. Für die Apoptoseuntersuchung wurden die Zellen, wie in Kapitel 2.3.4 beschrieben, ausgesät. Die Markierung der Zellen erfolgte nach dem vorgeschriebenen Protokoll von Immunochemistry Technologie. Zusätzlich wurden die Zellen mit AnnexinV (5 µg/ ml Annexinbindungspuffer) für 15 min inkubiert, zweimal mit 2 % FKS/ PBS gewaschen und in Kulturmedium aufgenommen. Die Immunmarkierungen wurden am konfokalen Laser Scanning Mikroskop unter Nutzung der entsprechenden Filterkombinationen ausgewertet (Anhang, Kapitel 8.2.8).

2.3.4.2 *Immunfluoreszenz-Färbung zum Internalisierungsversuch*

Für die Internalisierungsversuche wurden die Zellen, wie in Kapitel 2.3.4 beschrieben, ausgesät und mit 10 µl FITC markierten BCG (Kapitel 2.3.3.4) exponiert. Nach vorangegangenem Waschschrte mit 2 % FKS/ PBS wurden die adhärenz Zellen für 30 min mit 400 µl 2 % FKS/ TPBS geblockt und zweimal mit TPBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit den Primärantikörper (Kaninchen-anti-BCG) bei 4°C für 2 h inkubiert und danach zweimal mit TPBS gewaschen. Nach Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Ziege-anti-Kaninchen/ PE markiert) für 30 min bei 4°C wurden die Zellen zweimalig mit PBS gewaschen und mit 400 µl PBS versetzt. Die Immunmarkierungen wurden am konfokalen Laser Scanning Mikroskop unter Nutzung der entsprechenden Filterkombinationen ausgewertet (Anhang, Kapitel 8.2.8)

2.4 Rasterelektronenmikroskopie

Bei der Rasterelektronenmikroskopie (REM) wird ein Elektronenstrahl über das zu untersuchende Objekt geführt und die Wechselwirkungen der Elektronen mit dem Gold-beschichteten Objekt zur Erzeugung eines Bildes des Objekts genutzt und bildlich dargestellt.

2.4.1 Aufarbeitung und Scannen der Proben

Für die Rasterelektronenmikroskopie wurden 500 µl der Zellen in einer Konzentration von 1×10^5 / ml auf Glasplättchen in 24 well Platten ausgesät und 24 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach den Inkubationszeiten von 1 h, 4 h, 12 h und 24 h wurden die Zellen zunächst dreimal vorsichtig mit 2 % FKS/ PBS gewaschen. Um den durch den starken Wasserverlust entstehenden Strukturartefakten entgegenzuwirken, wurden die Zellen zunächst mit 3 % Glutaraldehyd in Cacodylatpuffer für 1 h überschichtet und bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal für je 30 min in Cacodylatpuffer fixiert. Zum Entwässern wurden die Zellen einer aufsteigenden Alkoholreihe (30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 90 % und Ethanol absolut) zugeführt und jeweils für 15 min bei RT inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen kritisch-Punkt getrocknet und in einem BAL-TEC-SCD-005 Sputter Coater mit Goldstaub beschichtet (BAL-TEC, Germany). Die Zellen wurden an einem Scanning Electron Microscope LEO-1450VP (ZEISS, Germany) bei 15 kV detektiert.

2.5 Genexpressionsanalyse

Die Mikroarrayanalyse ermöglicht es einen Großteil aller exprimierter Gene auf einmal zu untersuchen und ein entsprechendes Expressionsprofil zu erstellen.

Zur Beschreibung der bei einer Exposition mit den BCG Stämmen S4-Jena und TICE ablaufenden Vorgänge wurden Genexpressionsanalysen mit Hilfe von Microarrays an mRNA von mit BCG exponierten Harnblasenkarzinomzellen durchgeführt. Es wurden die Genexpressions-muster von nicht exponierten Kontrollzellen mit BCG exponierten Zellen verglichen.

Dafür wurden die Zellen in einer Konzentration von 1×10^6 / 5 ml in Kulturmedium ausgesät und für 24 h bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Nach Zweimaligen waschen der adhärennten Zellen mit 2 % FKS/ PBS erfolgte die Exposition mit 100 µl BCG

(Konzentration: 1×10^8 CFU/ ml). Es erfolgte eine Inkubation der Zellen für 1 h, 4 h, 12 h und 24 h bei 37°C und 5 % CO im Brutschrank.

2.5.1 RNA-Isolierung

Für die Isolierung der mRNA wurde ein RNAeasy™ Mini Kit (Qiagen) verwendet. Dafür wurden die zu untersuchenden Zellproben nach dem, von der Firma Qiagen vorgegebenen Isolierungsprotokoll verarbeitet. Zusätzlich wurden alle RNA-Proben mit RNase-freier DNase I auf den Säulchen behandelt, um Verunreinigungen durch DNA zu verhindern. Durch diese Technik wurden ca. 35 – 40 µl RNA-Lösung isoliert. Zur Lagerung wurden die RNA-Proben bei – 80°C eingefroren. Zur Quantifizierung der isolierten RNA wurde die Absorption photometrisch unter Verwendung eines Spektrophotometers "Nano Drop" bestimmt. Dafür wurde jeweils 1 µl unverdünnter Probenlösung auf die Messvorrichtung aufgetragen und das Verhältnis der Absorption der Lösung von 260 nm zu 280 nm bestimmt. Um für die Microarrayanalyse gleiche RNA-Probenkonzentrationen zu erreichen, wurde die RNA aufkonzentriert. Dafür wurde die RNA für 30 min in einer Vakuumzentrifuge bei 16.000 g und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde die getrocknete RNA mit DEPC-H₂O auf eine Konzentrationen von 10 µg/ µl eingestellt. Die Lagerung der RNA-Proben erfolgte bei – 80°C.

2.5.2 Microarrayanalyse

Die Microarrayanalyse zur Untersuchung der mRNA-Expression von Kontrollzellen und BCG exponierten Zellen wurden nach den internen Protokollen der Firma SIRSLab GmbH durchgeführt.

Die mRNA Proben wurden amplifiziert und nicht exponierten und BCG exponierten Zellen jeweils zu Konzentrationen mit Cy3 bzw. Cy5 Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt. Diese Vergleichspaare wurden nun auf jeweils einem Lab-Arraytor® human 60-inflammation Array hybridisiert und nach einigen Waschschritten das Emmisionssignal der Fluoreszenzfarbstoffe detektiert. Die Intensität der Fluoreszenzsignale korreliert mit der mRNA-Konzentration der Probe.

2.6 Polyketidanalyse

Für die Polyketidanalyse wurden die verschiedenen Ansätze (Tabelle 6, Tabelle 7) bei 10.000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das entstandene Pellet wurde in 80 µl A. dest. aufgenommen und die Suspension in Glasröhrchen überführt. Nach Zugabe von 100 µl Chloroform und 200 µl Methanol wurden die Proben für 10 min bei 37 °C im Wasserbad mit Ultraschall behandelt. Nach einer weiteren Zugabe von 100 µl Chloroform wurden die Proben für 1 min geschüttelt und anschließend bei 3.000 g zentrifugiert. Es bildeten sich zwei Phasen, als Unterphase und Oberphase bezeichnet. Die Unterphase wurde vorsichtig mit einer Hamiltonspritze in eine neues Glasröhrchen überführt. Für die weiteren Untersuchungen (MS-Spektrometrie/ ^1H -NMR und HSQC NMR) wurden die erhaltenen Unterphasen im Argon-Strom eingetrocknet.

2.6.1 HSQC NMR

Für die HSQC-NMR wurden die Proben wie in Kapitel 2.6 beschrieben vorbehandelt. Die ^1H -NMR und HSQC Spektren wurden an einem Bruker Avance NMR Spektrometer (Bruker-Biospin, Karlsruhe), ausgerüstet mit einem TCI-Kryoprobenkopf (5 mm) bei einer Resonanzfrequenz von 500.13 MHz für ^1H und 125.75 MHz für ^{13}C gemessen. Die HSQC-Spektren (Messzeit: 15 h) wurden mit der hsqcetgp-Pulssequenz aufgezeichnet. Die Proben wurden in CDCl_3 als Lösungsmittel entweder in einem 5 mm Probenröhrchen (Lösungsmittelvolumen 600 µl) oder einem 2.5 mm Probenröhrchen (130 µl) bei einer Probentemperatur von 300 K gemessen. Die Chemischen Verschiebungen (δ) beziehen sich auf das Signal von Tetramethylsilan ($\delta_{\text{H}} = 0$; $\delta_{\text{C}} = 0$), das den Proben als interner Standard zugesetzt wurde. Die Spektren wurden mit TOPSPIN 2.0 (Bruker-Biospin) prozessiert.

2.6.2 MS HPLC

Für die HSQC-NMR wurden die Proben wie in Kapitel 2.6 beschrieben vorbehandelt. Die weiteren Untersuchungen wurden durch Dr. Lalk am Institut für Pharmazie, der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, durchgeführt.

2.7 Statistische Auswertung

Zur Bildung der Mittelwerte wurde das arithmetische Mittel berechnet. Die Überprüfung auf signifikante Unterschiede zwischen den Kontrollzellen und BCG exponierten Zellen sowie zwischen den beiden BCG Stämmen erfolgte mittels des Mann-Whitney(U)-Testes. Als signifikant wurden Unterschiede zwischen Gruppen betrachtet, wenn die zweiseitige Irrtumswahrscheinlichkeit $p \leq 0,05$ war, hoch-signifikant $p \leq 0,01$. Hierzu wurden die Programme Microsoft Excel XP und SPSS verwendet.

3 Ergebnisse

Die Instillationsbehandlung des nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms mit dem *Mykobakterium bovis* ssp. Bacillus-Calmette-Guérin ist laut Richtlinien der European Association of Urology (EAU) die Therapie der Wahl bei *High-grade* Karzinomen⁵⁶. Die molekularen Mechanismen für die antikanzerogene Wirkung dieser BCG Bakterien bei Harnblasenkarzinomzellen ist jedoch bis heute nicht ausreichend bekannt.

Bei der Therapie wird eine BCG-Suspension in einer physiologischen Kochsalzlösung mittels Katheter ca. sechs Wochen nach transurethraler Resektion in die Harnblase gegeben. Für die BCG-Therapie werden in Deutschland verschiedene Stämme verwendet. Der BCG Stamm S4-Jena wurde nach einer Multicenterstudie in der ehemaligen DDR als Harnblasentherapeutikum zugelassen. Nach Schließung des ZIMET wurden lyophilisierte und bis zu 20 Jahre alte Ampullen des S4-Jena Stammes im Institut für Medizinische Mikrobiologie Jena aufbewahrt. Dieser Stamm konnte im Jahr 2005 wieder erfolgreich angezüchtet werden (Abbildung 3).

Zu besseren Übersicht sind ausgewählte Abbildungen der Ergebnisse zusätzlich auf der beiliegenden CD dargestellt.



Abbildung 3: Tuberkulose Impfstoff des BCG-Institutes ZIMET in Jena.

Die lyophilisierten BCG wurden in physiologischer NaCl-Lösung resuspendiert und in Sauton-Lösung angezüchtet. Der S4-Jena Stamm wuchs in der charakteristischen blumenkohlartigen Struktur einer emersen BCG-Bakterienkultur.

3.1 Klonale Unterschiede der BCG Stämme

Die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) in Abbildung 4 zeigt genotypische Unterschiede (Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen) zwischen dem S4-Jena Stamm und den kommerziell für die Harnblasenkarzinomtherapie erhältlichen Stämmen RIVM, TICE und Connaught. Die Analyse zeigte bei dem S4-Jena Stamm eine 267 kbp große Bande. Diese fehlte den anderen getesteten Stämmen. Im Vergleich dazu besitzen diese Stämme zwei zusätzliche Banden mit den Größen 230 kbp und 134 kbp, die dem S4-Jena Stamm fehlen. Dies spricht dafür, dass durch eine Mutation eine Restriktionsstelle ausgelöscht wurde. Anschließend erfolgte daher eine Spoligotypisierung im Referenzzentrum für Mykobakterien in Borstel, welche die Zugehörigkeit des S4-Jena Stammes zu *Mykobakterium bovis* ssp. Bacillus-Calmette-Guérin bestätigte.

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der PFGE wurde der TICE Stamm zum Vergleich in die weiteren Untersuchungen mit einbezogen. Zusätzlich wurden die Unterschiede zwischen abgetöteten und lebenden BCG auf die Harnblasenkarzinomzellen untersucht. Alle nachfolgenden Experimente wurden an den Harnblasenkarzinomzelllinien T24 und Cal29 vorgenommen.

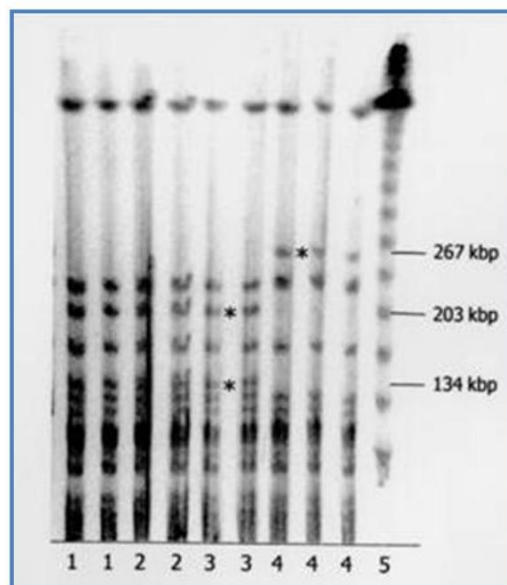


Abbildung 4: Pulsfeldgelelektrophorese-Profil der getesteten BCG-Stämme.

Von den BCG Stämmen RIVM, TICE und Connaught wurden jeweils zwei Präparationen und vom S4-Jena Stamm drei Präparationen auf das PFGE-Gel aufgetragen. 1: RIVM, 2: TICE, 3: Connaught, 4: S4-Jena, 5: Marker.

3.2 Effekt der S4-Jena und TICE Exposition auf die Genexpression der Harnblasenkarzinomzelllinien T24 und Cal29

Zur Bestimmung der molekularen Vorgänge nach Exposition mit BCG wurden zunächst Genexpressionsanalysen durchgeführt. Dafür wurden 780 Gene mittels eines Lab-Arraytor® human 60-inflammation der Firma SIRSLab untersucht. Dabei wurden die Änderungen der Genexpressionsprofile nach Exposition mit den beiden Stämmen S4-Jena und TICE näher charakterisiert. Nichtexponierte Zellen wurden als Kontrollen mitgeführt. Es galt zu klären, welche molekularen Mechanismen nach definierten Zeitpunkten den Ergebnissen der Internalisierungs-, Proliferations-, Zellzyklus- und Apoptoseuntersuchungen zugeordnet werden können. Bei der Darstellung der Signalwege wurden die Gene einbezogen, die sich in mindestens einem Zeitpunkt signifikant von Kontrollzellen unterschieden hatten. Die vollständigen Genlisten befinden sich im Anhang.

3.2.1 Effekt der S4-Jena und TICE Exposition auf die Genexpression von T24 Zellen

T24 Zellen wurden mit S4-Jena oder TICE BCG exponiert. Eine Stunde, 4 h, 12 h und 24 h nach Exposition wurde die RNA isoliert und eine Genexpressionsanalyse durchgeführt. Zu jedem Zeitpunkt wurden Kontrollen mitgeführt, deren RNA ebenfalls isoliert wurden. Die Expressionsmuster der exponierten Zellen wurden mit den Expressionsmustern der Kontrollzellen verglichen. Des Weiteren wurden Gen-Netzwerke des Harnblasenkarzinomsignalweges mit Hilfe der Ingenuity Software erstellt.

Genexpression von T24 Zellen nach Exposition mit lebenden und abgetöteten S4-Jena

Nach Exposition der T24 Zellen mit S4-Jena waren über einen Zeitraum von 24 h insgesamt 319 Gene differentiell reguliert. Davon waren 136 Gene sowohl von mit lebenden als auch mit abgetötetem S4-Jena exponierten T24 Zellen differentiell exprimiert. 68 Gene waren ausschließlich bei lebenden und 155 Gene bei abgetöteten S4-Jena exponierten Zellen differentiell reguliert. In Abbildung 5 ist die Genverteilung der signifikant differentiell exprimierten Gene graphisch dargestellt. Von den 780 Genen des

Mikroarrays waren drei Gene in allen Zeitpunkten bei den Zellen mit abgetöteten BCG differentiell reguliert. Dabei handelt es sich um die Gene CFH, INHBA und SART1. Nach Exposition mit lebenden BCG waren 10 Gene in allen vier Zeitpunkten differentiell reguliert: ASAHI, CCR5, CFH, CFHR4, EGR1, IL9, IL17D, MAP3K14, MAPK4 und XIAP.

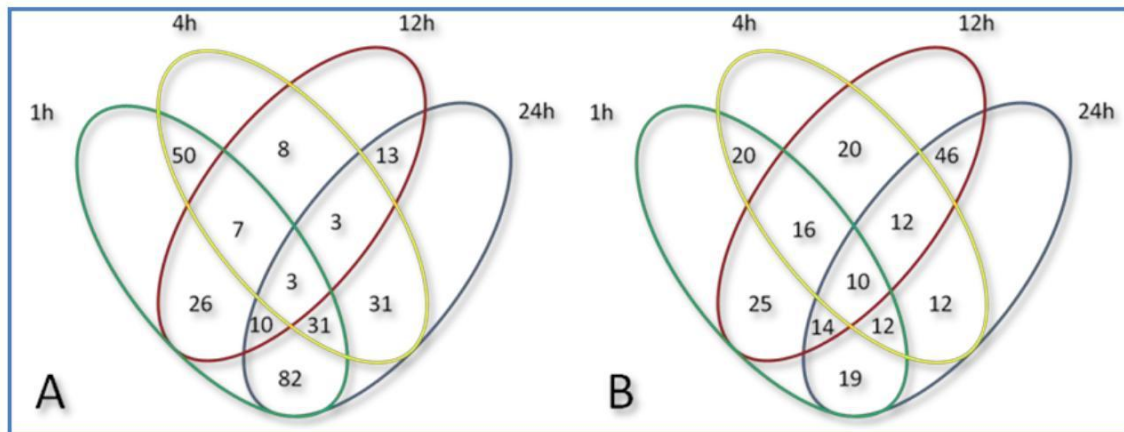


Abbildung 5: Venn Diagramm der Schnittmengen der Genexpression der T24 Zellen nach Exposition mit S4-Jena.

Schnittmengendiagramm der Genexpressionsverteilung in T24 Zellen 1 h, 4 h, 12 h, 24 h nach Exposition mit S4-Jena. Die Überschneidungen zeigen an, wie viele Gene zu den entsprechenden Zeitpunkten differentiell exprimiert wurden. (A: abgetötete S4-Jena BCG; B: lebende S4-Jena BCG)

Mit Hilfe der Ingenuity Software wurden Genexpressionsprofile des Harnblasenkarzinomsignalweges erstellt (Abbildung 6). Durch die Exposition der T24 Zellen mit dem S4-Jena Stamm stieg in diesem Signalweg die Genexpression der Gene EGFR, MDM2, EKR1/2 sowie E2F1. Dagegen sank die Expressionen der Gene VEGF, RB1, MEK1/2, H-RAS, RAS und DAPK1. Die IL-8 Genexpression sank 1 h nach Exposition mit abgetöteten BCG zunächst und stieg dann wieder an. Nach Exposition mit lebenden BCG stieg die Genexpression von IL-8 bereits nach 1 h.

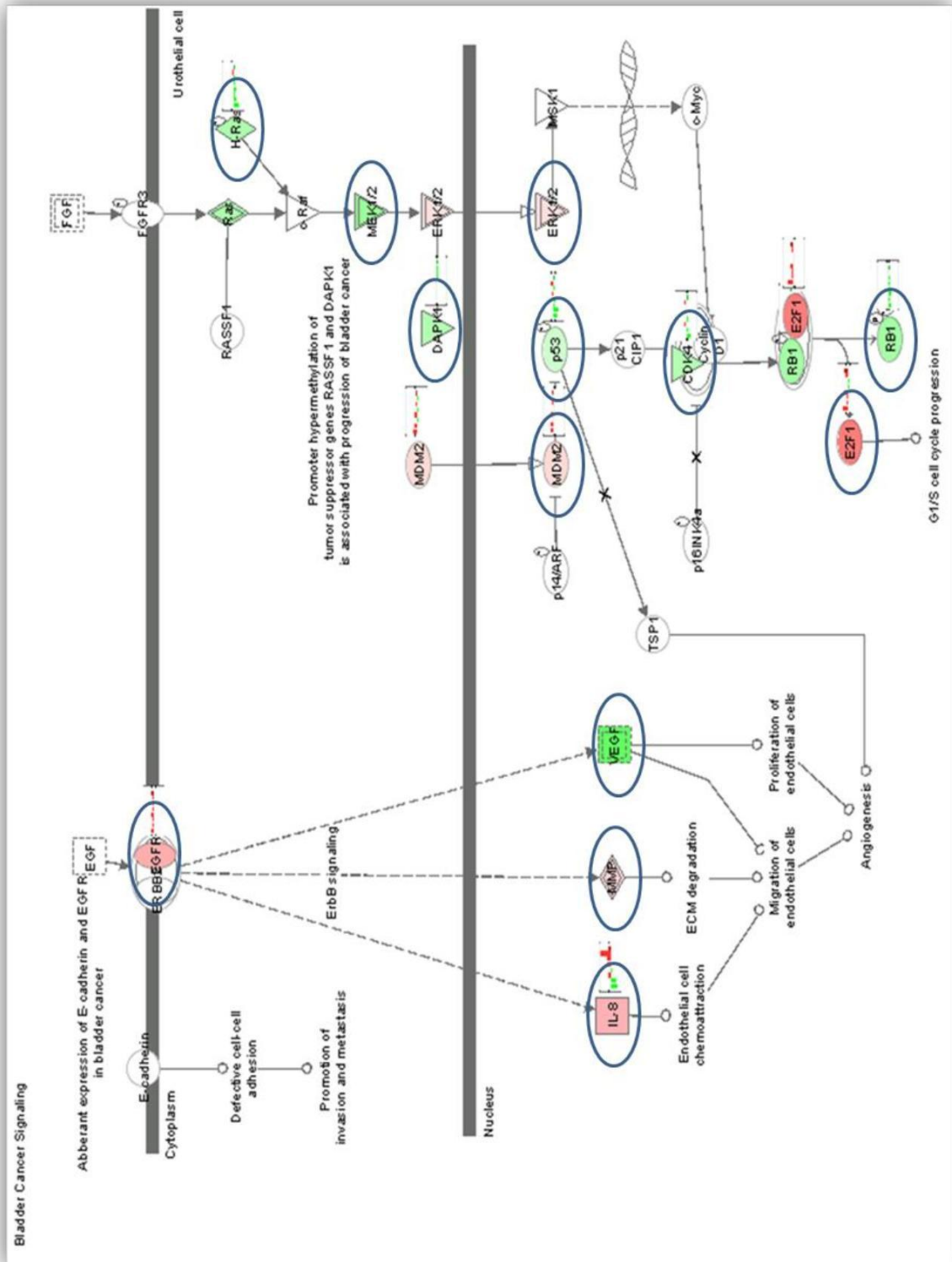


Abbildung 6: Harnblasenkarzinomsignalweg (Ingenuity-Software) nach Exposition von T24 Zellen mit S4-Jena.

Die Gene sind entsprechend ihrer log ratio Genexpressions Values zwischen BCG exponierten Zellen und Kontrollzellen farbig unterlegt. rote Gensymbole: Ansteigen der Genexpression; grüne Gensymbole: Absinken der Genexpression.

Genexpression von T24 Zellen nach Exposition mit lebenden und abgetöteten TICE

Nach einem Expositionszeitraum von 24 h mit TICE zeigten 182 Gene eine differentielle Expression im Vergleich zu nicht exponierten T24 Zellen (Abbildung 7). 72 Gene waren sowohl bei den mit lebenden als auch bei den mit abgetöteten TICE exponierten T24 Zellen differentiell exprimiert. 66 Gene waren ausschließlich mit lebenden und 44 Gene mit abgetöteten TICE BCG exponierten Zellen differentiell reguliert. Von den 780 Genen des Mikroarrays waren die Gene CFH und CASP5 nach Exposition mit abgetöteten TICE in allen vier Zeitpunkten differentiell reguliert. Nach Exposition mit lebenden TICE waren ebenfalls die Gene CFH und CASP5 sowie die Gene CFHR1 und NFKBIA differentiell exprimiert.

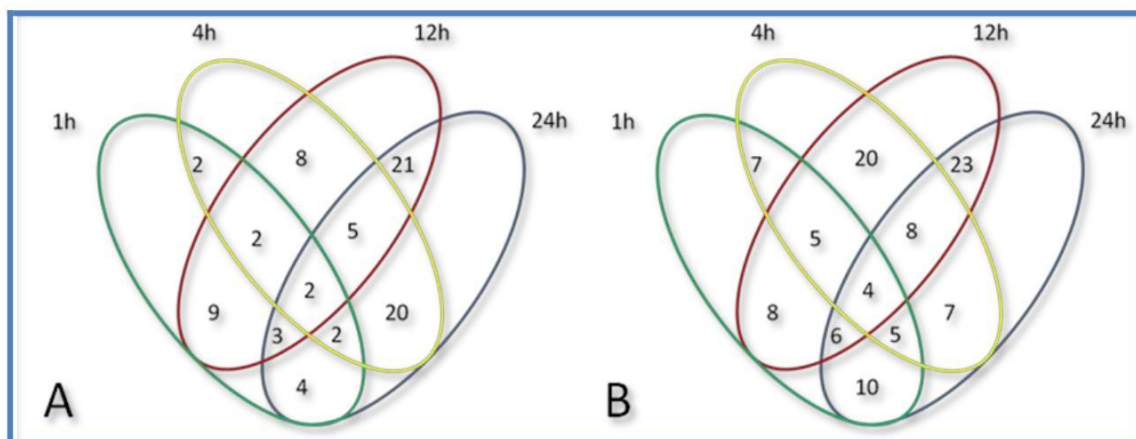


Abbildung 7: Venn Diagramm der Schnittmengen der Genexpression der T24 Zellen nach Exposition mit TICE.

Schnittmengendiagramm der Genexpressionsverteilung in T24 Zellen 1 h, 4 h, 12 h, 24 h nach Exposition mit TICE. Die Überschneidungen zeigen an, wie viele Gene zu den entsprechenden Zeitpunkten differentiell exprimiert wurden. (A: abgetötete TICE; B: lebende TICE)

Abbildung 8: Harnblasenkarzinomsignalweg (Ingenuity-Software) nach Exposition von T24 Zellen mit TICE.

Die Gene sind entsprechend ihrer log ratio Genexpressions Values zwischen BCG exponierten Zellen und Kontrollzellen farbig unterlegt. rote Gensymbole: Ansteigen der Genexpression; grüne Gensymbole: Absinken der Genexpression.



3.2.2 Effekt der S4-Jena und TICE Exposition auf die Genexpression von Cal29 Zellen

Cal29 Zellen wurden mit den BCG Stämmen S4-Jena oder TICE exponiert. Eine Stunde, 4 h, 12 h und 24 h nach Exposition, sowie von Kontrollzellen, wurde die RNA isoliert und eine Genexpressionsanalyse durchgeführt. Die Expressionsmuster der exponierten Zellen wurden mit den Expressionsmustern der Kontrollzellen verglichen. Ebenfalls wurden Gen-Netzwerke des Harnblasenkarzinomsignalweges mit Hilfe der Ingenuity Software erstellt.

Genexpression von Cal29 Zellen nach Exposition mit lebenden und abgetöteten S4-Jena

Nach Exposition der Cal29 Zellen mit S4-Jena waren insgesamt 144 Gene über den Zeitraum von 24 h differentiell reguliert. 38 Gene waren sowohl bei lebenden als auch bei abgetöteten S4-Jena exponierten Cal29 Zellen differentiell reguliert. 24 Gene waren ausschließlich bei lebenden und 82 Gene bei abgetöteten S4-Jena exponierten Cal29 Zellen differentiell reguliert. Von den 780 Genen des Mikroarray waren vier Gene nach Exposition mit abgetöteten S4-Jena in allen vier Zeitpunkten differentiell reguliert. Dabei handelt es sich um die Gene CD55, CFH, FOXC1, und IL-9. Nach Exposition mit lebenden S4-Jena waren ebenfalls die Gene CFH, FOXC1, IL-9 sowie MAPK7 differentiell reguliert (Abbildung 9).

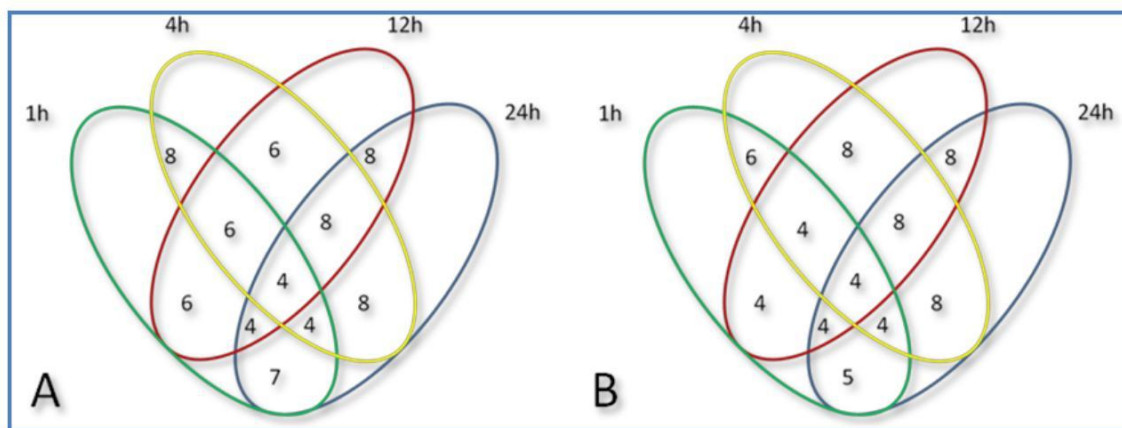


Abbildung 9: Venn Diagramm der Schnittmengen der Genexpression der Cal29 Zellen nach Exposition mit S4-Jena.

Schnittmengendiagramm der Genexpressionsverteilung in T24 Zellen 1 h, 4 h, 12 h, 24 h nach Exposition mit S4-Jena. Die Überschneidungen zeigen an, wie viele Gene zu den entsprechenden Zeitpunkten differentiell exprimiert wurden. (A: abgetötete S4-Jena; B: lebende S4-Jena)

Genexpression von Cal29 Zellen nach Exposition mit lebenden und abgetöteten TICE

Nach Exposition der Cal29 Zellen mit dem TICE Stamm waren insgesamt 586 Gene differentiell über den Zeitraum von 24 h reguliert (Abbildung 11). 384 Gene waren sowohl bei den mit lebenden als auch bei den mit abgetöteten TICE exponierten Cal29 Zellen differentiell exprimiert. 53 Gene waren ausschließlich bei mit lebenden und 149 Gene bei mit abgetöteten TICE exponierten Zellen differentiell reguliert. Anhand des Schnittmengendiagramms wird deutlich, dass zu allen vier Zeitpunkten 51 Gene nach Exposition mit abgetöteten und 97 Gene mit lebenden TICE differentiell reguliert waren.

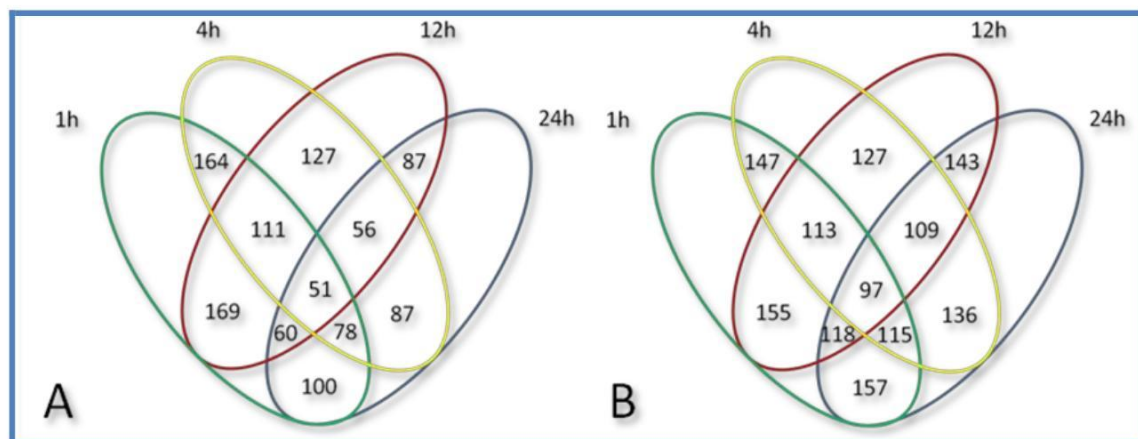


Abbildung 11: Venn Diagramm der Schnittmengen der Genexpression der Cal29 Zellen nach Exposition mit TICE.

Schnittmengendiagramm der Genexpressionsverteilung in T24 Zellen 1 h, 4 h, 12 h, 24 h nach Exposition mit TICE. Die Überschneidungen zeigen an, wie viele Gene zu den entsprechenden Zeitpunkten differentiell exprimiert wurden. (A: abgetötete TICE; B: lebende TICE)

In Abbildung 12 sind die Gene dargestellt, welche im Harnblasenkarzinomsignalweg eine wichtige Rolle spielen. Nach Exposition der Cal29 Zellen mit dem TICE Stamm sank in diesem Signalweg die Expression der Gene ERK1/2, MDM2, VEGF und EGFR. Dagegen stieg die Expression der Gene Cdk4, p21, Cyclin D1, H-RAS, RAS und DAPK1. Die IL-8 Genexpression stieg nach Exposition mit abgetöteten TICE langsam an, wohingegen sie nach Exposition mit lebenden TICE bereits nach 1 h einen hoch signifikanten Anstieg erreichte.

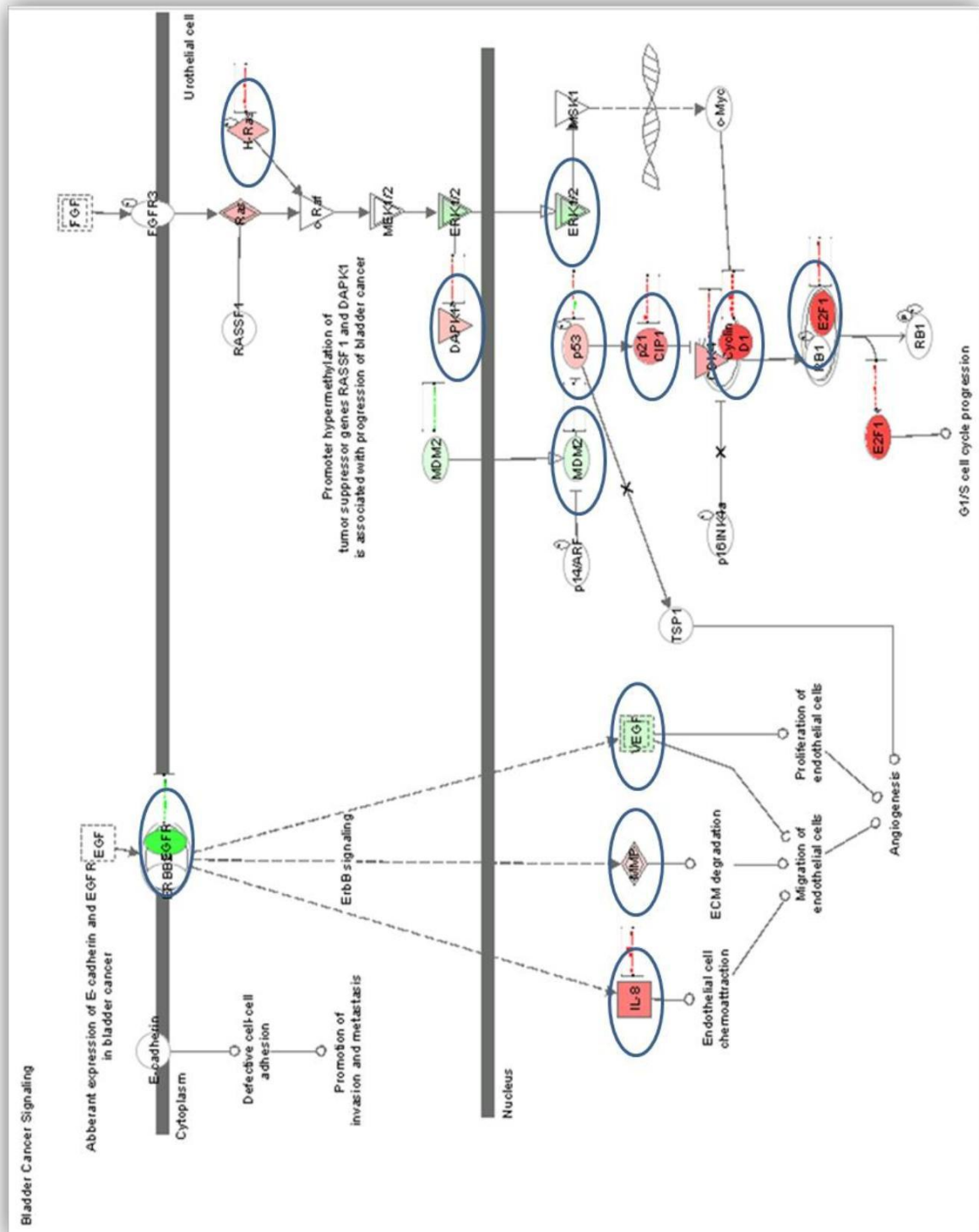


Abbildung 12: Harnblasenkarzinomsignalweg (Ingenuity-Software) nach Exposition von Cal29 Zellen mit TICE.

Die Gene sind entsprechend ihrer log ratio Genexpressions Values zwischen BCG exponierten Zellen und Kontrollzellen farbig unterlegt. rote Gensymbole: Ansteigen der Genexpression; grüne Gensymbole: Absinken der Genexpression.

3.3 Zusammenfassung der Genexpression

Vergleicht man die beiden BCG Stämme hinsichtlich ihre Wirkung auf die zwei Harnblasenkarzinomzelllinien, fallen besonders folgende Gene auf: Tabelle 1

Tabelle 1: Genexpression nach Exposition von T24 und Cal29 Zellen mit S4-Jena und TICE

		abgetötete BCG				lebende BCG			
		1h	4h	12h	24h	1h	4h	12h	24h
HRas									
T24	S4	-0,97	-0,46	-0,20	-0,43	-0,23	-0,26	0,05	-0,35
	TICE	0,27	0,02	-0,26	-0,37	0,10	-0,05	-0,05	-0,25
Cal29	S4	-0,26	0,17	-0,09	-0,07	-0,14	0,08	-0,17	-0,05
	TICE	0,64	0,67	0,32	0,03	0,65	0,43	0,60	0,44
Survivin									
T24	S4	-0,73	-0,33	-0,22	-0,34	-0,52	-0,45	-0,34	-0,38
	TICE	-0,24	-0,24	-0,48	-0,78	0,04	-0,37	-0,25	-0,49
Cal29	S4	-0,42	-0,09	-0,20	-0,24	-0,23	-0,12	-0,27	-0,27
	TICE	1,32	1,04	1,30	0,79	1,69	1,26	1,41	1,25
Cdk4									
T24	S4	-0,79	-0,38	0,12	-0,43	-0,17	-0,05	0,23	-0,33
	TICE	-0,01	-0,13	-0,47	-0,64	-0,06	-0,16	-0,44	-0,56
Cal29	S4	-0,13	0,11	-0,08	-0,01	0,00	0,04	-0,07	-0,37
	TICE	0,46	0,54	0,16	0,60	0,43	0,35	0,45	0,52
FOS									
T24	S4	0,45	0,21	0,85	0,55	0,68	0,54	1,00	0,00
	TICE	-0,02	0,27	0,17	0,30	0,28	0,44	0,37	0,31
Cal29	S4	0,28	0,00	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,22
	TICE	0,59	-0,75	-0,97	-0,16	1,48	-0,91	-0,78	-0,52
HMGB1									
T24	S4	-0,68	-0,45	-0,32	-0,11	-0,13	-0,17	0,11	-0,17
	TICE	0,06	0,05	-0,16	-0,34	-0,18	0,00	-0,14	-0,26
Cal29	S4	-0,29	-0,15	-0,13	0,01	-0,11	0,04	0,08	0,27
	TICE	0,25	0,32	-0,32	0,50	0,16	0,43	0,27	0,20
IL-8									
T24	S4	-1,16	-0,99	0,37	-0,09	0,66	0,65	1,77	0,35
	TICE	-0,50	0,23	0,53	0,37	0,13	0,51	0,81	0,62
Cal29	S4	-0,14	0,11	-0,01	0,19	0,08	0,23	0,15	0,31
	TICE	1,15	0,13	0,20	1,46	2,31	0,30	0,28	0,81
CFH									
T24	S4	-0,99	-0,57	-0,97	-0,99	-1,02	-1,05	-0,43	-0,89
	TICE	-0,9	-1,56	-1,37	-1,18	-1,43	-1,54	-1,33	-1,42
Cal29	S4	-1,17	-1,00	-0,72	-0,99	-0,79	-0,61	-0,85	-0,96
	TICE	-0,23	-0,10	-0,62	-0,71	0,00	-0,33	-0,50	-0,16

3.4 Adhärenz- und Internalisierungsverhalten der BCG Stämme S4-Jena und TICE nach Exposition von T24 und Cal29 Zellen

Die beiden BCG Stämme wurden auf ihre Fähigkeit hin überprüft, an die Karzinomzellen zu adhären und zu internalisieren. Dafür wurden Adhärenz und Internalisierung von BCG mittels durchflusszytometrischer Analyse quantitativ gemessen und im Laser Scanning Mikroskop (LSM) sowie im Raster Elektronen Mikroskop (REM) morphologisch untersucht. Für die Durchflusszytometrie und die LSM Aufnahmen wurden die BCG vor der Exposition mit FluoresceinIsoThioCyanat (FITC) markiert. Nach den vorgegebenen Zeiten wurden extrazellulär-adhärenente Bakterien mit polyklonalem anti-BCG-Antikörper sowie einem entsprechenden sekundären PhycoErythrin (PE) markierten Antikörper inkubiert. Dadurch konnte eine Quantifizierung der extra- sowie intrazellulären BCG erstellt werden. Bei den REM Aufnahmen wurden die Zellen nach den angegeben Zeiten fixiert und adhärenente BCG optisch sichtbar gemacht. Ebenfalls konnte dadurch der Vorgang der BCG-Endozytose veranschaulicht werden.

Die Exposition mit den beiden BCG Stämmen führte nur in den T24 Zellen zu einer Erhöhung der IL-6 Expression. Dabei erreichte jedoch nur der S4-Jena Stamm nach 24 h Exposition mit abgetöteten und nach 12 h und 24 h mit lebenden BCG eine signifikante Erhöhung. Dem gegenüber sank die IL-6 Expression in den Cal29 Zellen signifikant nach 12 h Exposition mit TICE. Die Exposition der Cal29 Zellen mit abgetöteten oder die Exposition mit lebenden S4-Jena führte zu keiner relevanten Expressionsveränderung im gemessenen Zeitraum.

Tabelle 2: Zeitabhängige IL-6 Genexpression nach Exposition mit BCG.

Die Zelllinien T24 und Cal29 wurden mit beiden BCG Stämmen exponiert und zeitabhängig die Veränderung der Genexpression untersucht.

		abgetötete BCG				lebende BCG			
		1h	4h	12h	24h	1h	4h	12h	24h
T24	S4	-0,13	0,22	0,37	0,50	0,20	0,38	1,44	0,96
	TICE	0,13	0,21	0,30	0,36	-0,14	0,18	0,20	0,34
Cal29	S4	-0,07	-0,16	0,08	0,07	0,07	-0,10	0,19	0,20
	TICE	-0,08	-0,13	-0,69	-0,08	-0,23	-0,10	0,10	-0,13

Die gemessene IL-6 Genexpressionserhöhung der T24 Zellen nach Exposition mit S4-Jena führte nach 24 h zu keiner relevanten Erhöhung der $\alpha 5$ -Integrin Genexpression. Jedoch zeigte sich, dass die Exposition der Cal29 Zellen nach 12 h mit abgetöteten TICE zum Absinken der $\alpha 5$ -Integrin Genexpression führte, zeitgleich wie die IL-6 Genexpression (Tabelle 3).

Tabelle 3: Zeitabhängige $\alpha 5$ -Integrin Genexpression nach Exposition mit BCG.

Die Zelllinien T24 und Cal29 wurden mit beiden BCG Stämmen exponiert und zeitabhängig die Veränderung der Genexpression untersucht.

		abgetötete BCG				lebende BCG			
		1h	4h	12h	24h	1h	4h	12h	24h
T24	S4	-0,29	-0,05	-0,13	-0,02	0,05	-0,06	0,12	0,09
	TICE	0,07	-0,01	0,06	-0,03	0,13	0,05	0,24	-0,14
Cal29	S4	-0,06	-0,32	-0,09	0,01	-0,10	-0,22	0,08	0,06
	TICE	-0,08	0,09	-0,48	-0,06	-0,40	0,00	0,13	-0,10

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass in den T24 Zellen die $\beta 1$ -Integrin Expression bereits nach 1 h Exposition mit beiden abgetöteten BCG Stämmen signifikant sank. Im weiteren Zeitverlauf stieg sie langsam wieder an. Dagegen führte die Exposition der Cal29 Zellen mit abgetöteten TICE nach 24 h zu einer signifikanten $\beta 1$ -Integrin Expressionserhöhung.

Tabelle 4: Zeitabhängige $\beta 1$ -Integrin Genexpression nach Exposition mit BCG.

Die Zelllinien T24 und Cal29 wurden mit beiden BCG Stämmen exponiert und zeitabhängig die Veränderung der Genexpression untersucht.

		abgetötete BCG				lebende BCG			
		1h	4h	12h	24h	1h	4h	12h	24h
T24	S4	-0,43	-0,31	-0,15	-0,36	-0,23	-0,28	-0,32	-0,42
	TICE	-0,43	-0,24	-0,32	-0,27	-0,15	-0,25	-0,33	-0,12
Cal29	S4	-0,36	-0,10	-0,14	-0,21	-0,15	0,01	-0,14	-0,07
	TICE	0,20	0,23	-0,20	0,66	0,28	0,36	0,11	0,03

3.4.1 Adhärenz- und Internalisierungsverhalten von S4-Jena und TICE nach Exposition von T24 Zellen

Abbildung 13 zeigt die durchflusszytometrische Analyse der Adhärenz- und Internalisierungsraten von abgetöteten S4-Jena und TICE nach Exposition der T24 Zellen. Bei beiden Stämmen kam es über den Zeitraum von 24 h zu einer ansteigenden Adhärenz mit anschließender Internalisierung der BCG.

Nach 1 h konnte nachgewiesen werden, dass die BCG an den Zellen adhäreren und von den Zellen internalisiert wurden. Zu diesem Zeitpunkt waren über 30 % der Zellen mit BCG besetzt. Im weiteren Zeitverlauf von 4 h, 12 h und 24 h nahm die Internalisierungsrate bei annähernd gleichbleibender Adhärenzrate stetig zu. So waren bereits nach 12 h bei beiden Stämmen 80 % der Zellen mit BCG besetzt. Nach 24 h waren nur noch 10 % der detektierten Zellen nicht mit BCG besetzt. Dabei konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Exposition mit dem S4-Jena oder mit dem TICE

Stamm nachgewiesen werden. Ein signifikanter Unterschied zwischen abgetöteten (Abbildung 14) und lebenden BCG war jedoch nicht nachweisbar.

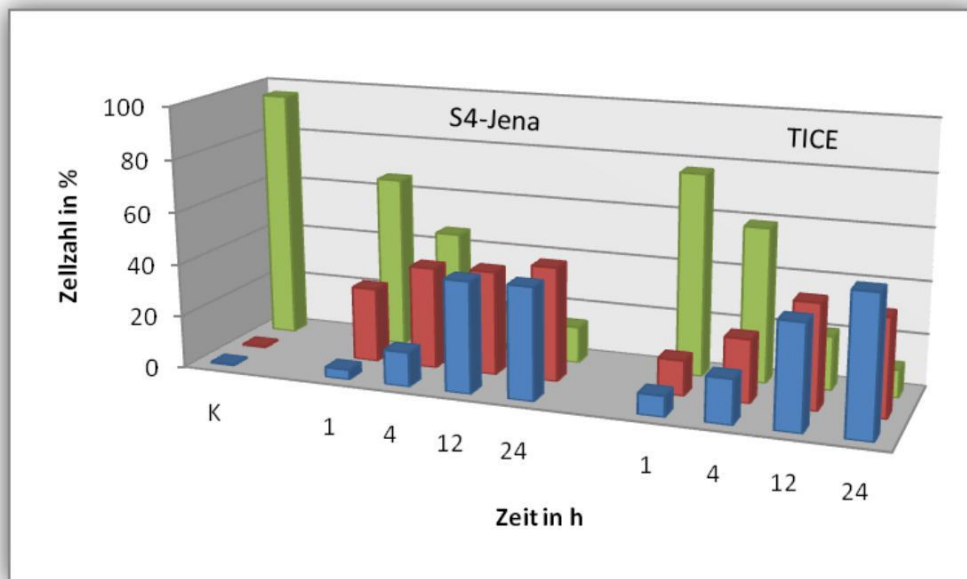


Abbildung 13: Adhärenz- und Internalisierungsverhalten von abgetöteten S4 Jena und TICE nach Exposition von T24 Zellen.

Durchflusszytometrische Analyse zum Adhärenz- und Internalisierungsverhalten der abgetöteten S4 Jena und TICE nach Exposition der T24 Zellen. Abgebildet sind die Mittelwerte sechs unabhängiger Experimente (grün: ohne BCG; rot: Zellen mit adhärenierten BCG; blau: Zellen mit internalisierten BCG), *: $p < 0,05$.

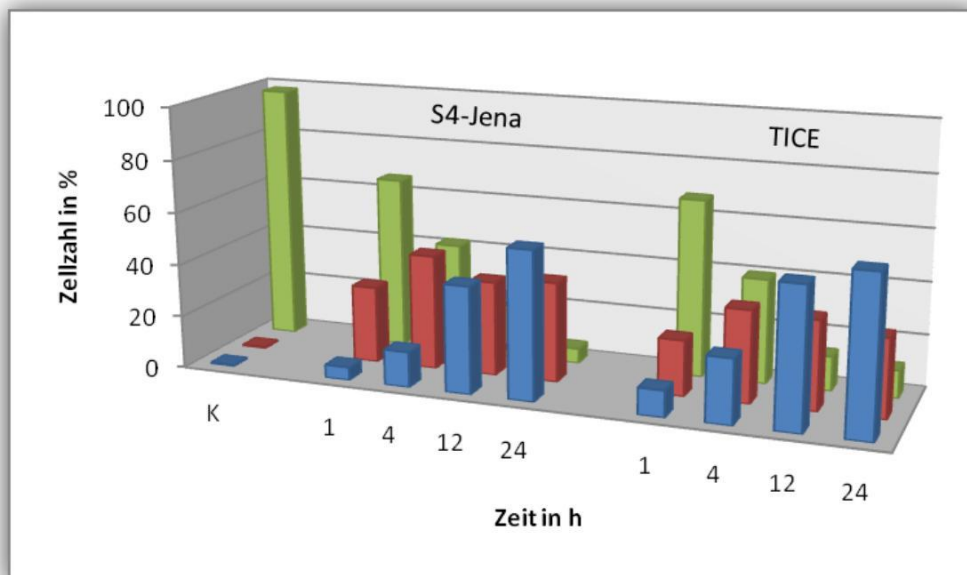


Abbildung 14: Adhärenz- und Internalisierungsverhalten von lebenden S4 Jena und TICE nach Exposition von T24 Zellen.

Durchflusszytometrische Analyse zum Adhärenz- und Internalisierungsverhalten der lebenden S4 Jena und TICE nach Exposition der T24 Zellen. Abgebildet sind die Mittelwerte sechs unabhängiger Experimente (grün: ohne BCG; rot: Zellen mit adhärenierten BCG; blau: Zellen mit internalisierten BCG), *: $p < 0,05$.

Die Internalisierung am Beispiel von T24 Zellen 24 h nach Exposition mit dem S4-Jena Stamm ist in Abbildung 15 B gezeigt. Der 3D Scann zeigt adhären BCG (rot) und die internalisierten BCG (grün). Die LSM Durchlichtaufnahme in Abbildung 15 A zeigt die morphologischen Veränderungen der Zellen, nachdem sie BCG internalisiert hatten. Diese Zellen rundeten sich ab und verloren anschließend den Kontakt zum Kulturflaschenboden. Dagegen zeigten die Zellen, an denen BCG nur adhären, noch keine morphologischen Veränderungen. Eine Animation der 3D Abbildung ist auf der beiliegenden CD dargestellt.

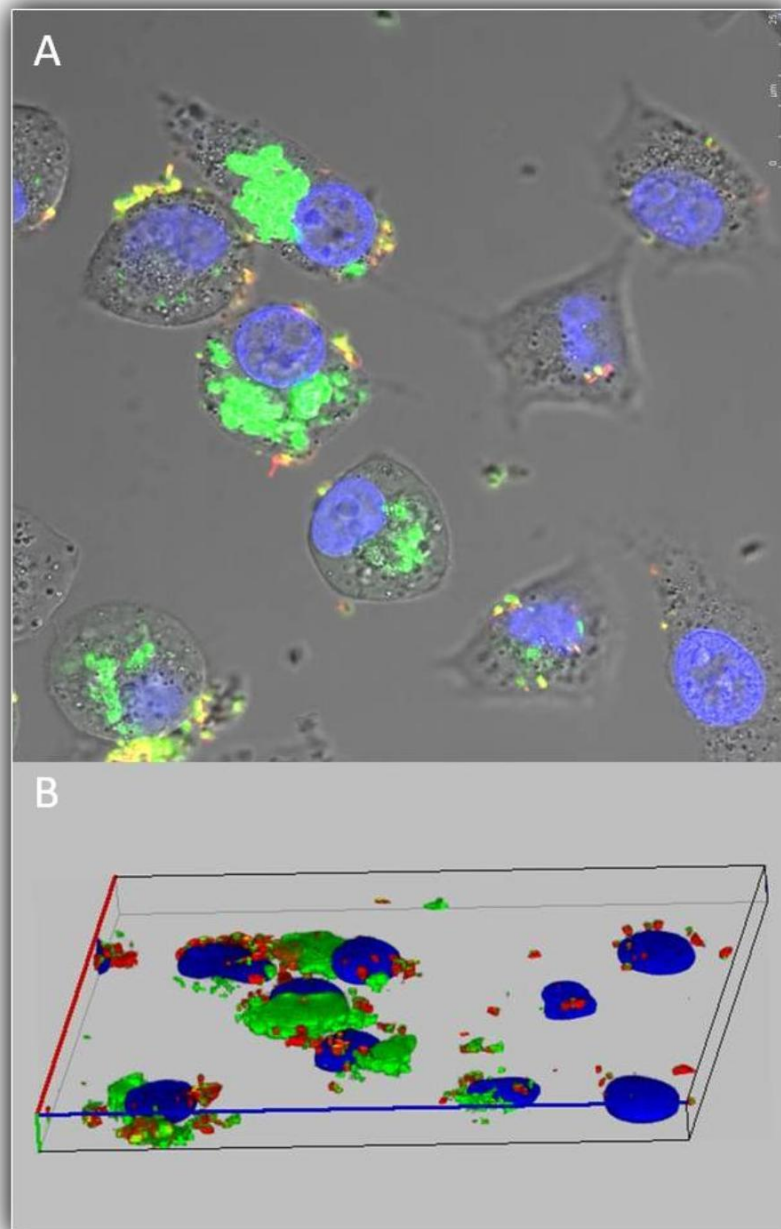


Abbildung 15: LSM Aufnahme von T24 Zellen nach Exposition mit S4-Jena.

A: Durchlichtaufnahme von T24 Zellen 24 h nach Exposition mit S4 Jena. Die BCG wurden vor Exposition mit FITC (grün) markiert. Nach 24 h Exposition wurden die Zellen fixiert und mit anti-BCG sowie dem PE markierten sekundären Antikörper (rot) inkubiert. Kernfärbung (Hoechst 3342, blau); B: LSM 3D Scan von A; Messbalken: 25 µm

In Abbildung 16 A ist beispielhaft eine REM-Aufnahme mit lebenden S4-Jena exponierten T24 Zellen abgebildet. Ein vergrößerter Ausschnitt (Abbildung 16 B) zeigt deutlich, dass die BCG an die Zellen adhärirten. Es bildeten sich Endosome (Abbildung 16 B, Pfeil), welche die BCG internalisierten und bereits dabei waren, sich zu schließen.

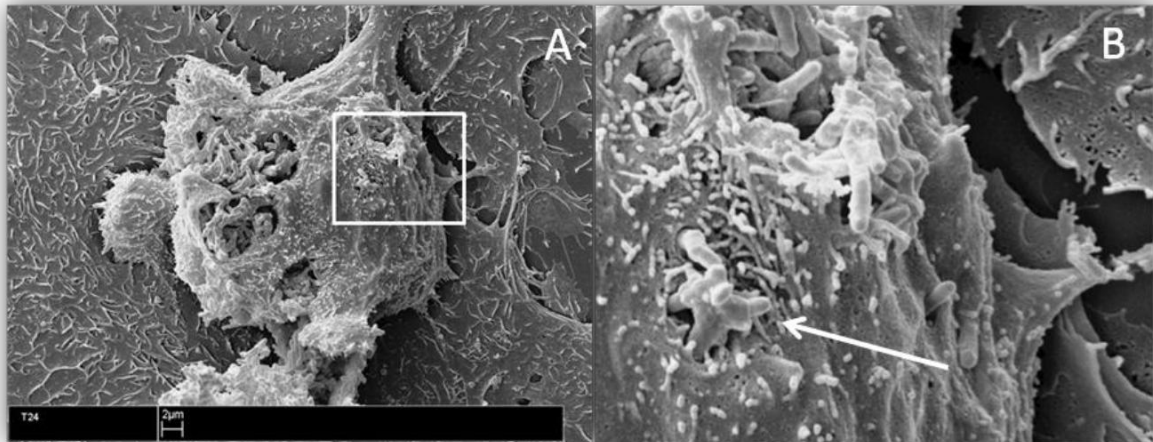


Abbildung 16: REM Aufnahme von T24 Zellen nach Exposition mit S4-Jena.

REM-Aufnahme der Internalisierung von lebenden S4-Jena. T24 Zellen wurden 12 h mit lebenden S4-Jena exponiert. A: Übersichtsaufnahme der exponierten Zellen. B: Detailaufnahme der Internalisierung. Messbalken: 2 µm

Die Aufnahmen in Abbildung 17 A zeigen T24 Zellen 4 h nach Exposition mit abgetöteten TICE BCG. Die betroffenen Zellen rundeten sich ab und lösten sich vom Zellverband. Die Detailaufnahme in Abbildung 17 A zeigt eine beginnende Endozytose (Abbildung 17 B, Pfeil).

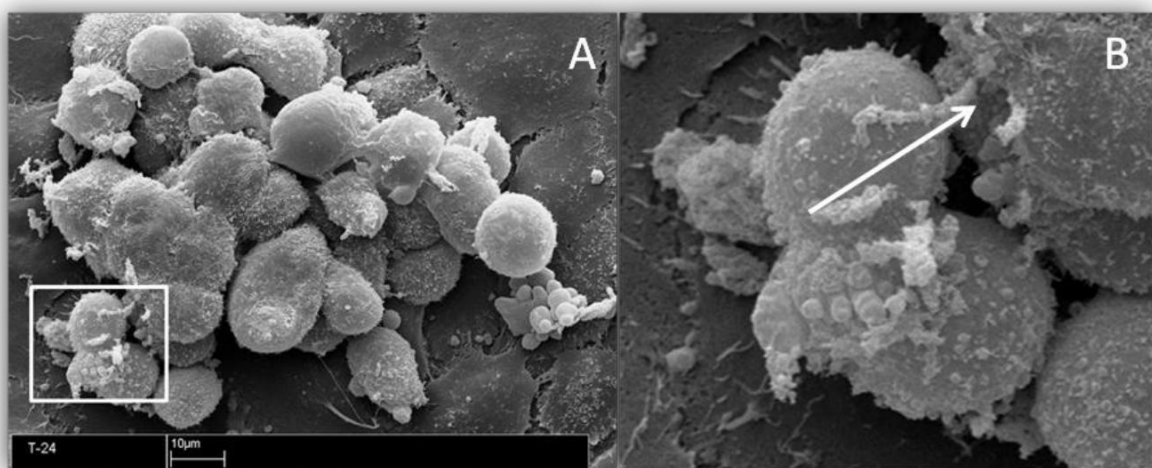


Abbildung 17: REM Aufnahme von T24 Zellen nach Exposition mit TICE.

REM-Aufnahme der Internalisierung von lebenden TICE. T24 Zellen wurden 12 h mit lebenden TICE exponiert. A: Übersichtsaufnahme der exponierten Zellen. B: Detailaufnahme der Internalisierung. Messbalken: 10 µm

Die vorliegenden Ergebnisse zeigten, dass die beiden Stämme S4-Jena und TICE keine wesentlichen Unterschiede in ihrem Adhärenz- und Internalisierungsverhalten nach Exposition der T24 Zellen aufwiesen. Weiterhin konnten keine Unterschiede zwischen abgetöteten und lebenden BCG nachgewiesen werden.

3.4.2 Adhärenz- und Internalisierungsverhalten von S4-Jena und TICE nach Exposition von Cal29 Zellen

Im Vergleich zu der T24 Zelllinie war bei der Cal29 Zelllinie ein deutlicher Unterschied im Adhärenz- und Internalisierungsverhalten zwischen den beiden BCG-Stämmen nachweisbar. Die durchflusszytometrischen Analysen der exponierten Cal29 Zellen zeigten, dass die abgetöteten TICE eine geringere Adhärenzrate im Vergleich zu abgetöteten S4-Jena aufwiesen. Des Weiteren kam es nach der Exposition mit abgetöteten TICE zu einer signifikant geringeren Internalisierungsrate über einen Zeitraum von 12 h und 24 h (Abbildung 18).

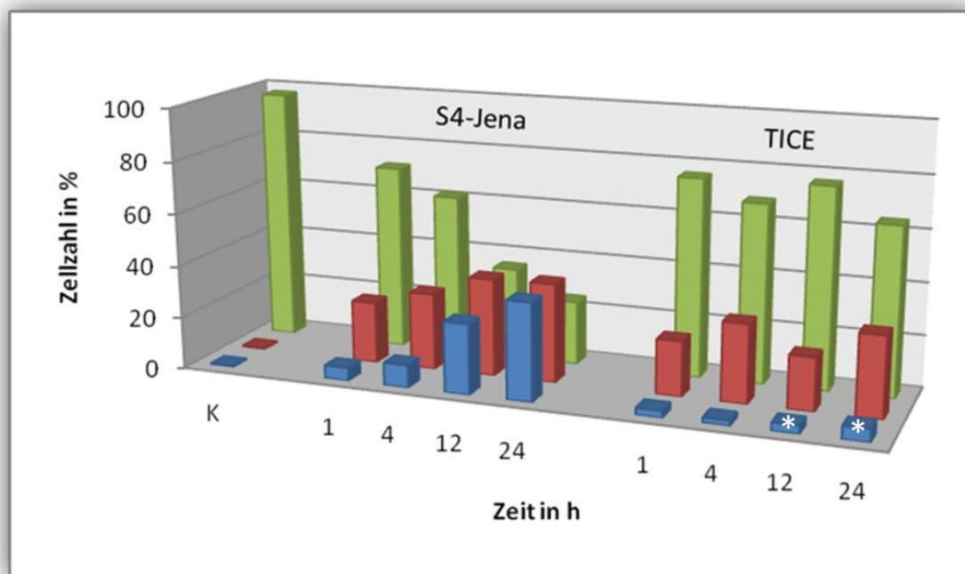


Abbildung 18: Adhärenz- und Internalisierungsverhalten von lebenden S4 Jena und TICE nach Exposition von Cal29 Zellen.

Durchflusszytometrische Analyse zum Adhärenz und Internalisierungsverhalten der lebenden S4 Jena und TICE nach Exposition der Cal29 Zellen. Abgebildet sind die Mittelwerte sechs unabhängiger Experimente. grün: ohne BCG; rot: Zellen mit adhären BCG; blau: Zellen mit internalisierten BCG, *: $p < 0,05$.

In Abbildung 19 sind die Adhärenz- sowie Internalisierungsraten von lebenden S4-Jena und TICE BCG dargestellt. Auch hier wird deutlich, dass die Internalisierungsrate der mit TICE exponierten Cal29 Zellen nach 24 h signifikant geringer ausfällt, als bei den mit S4-Jena exponierten Zellen.

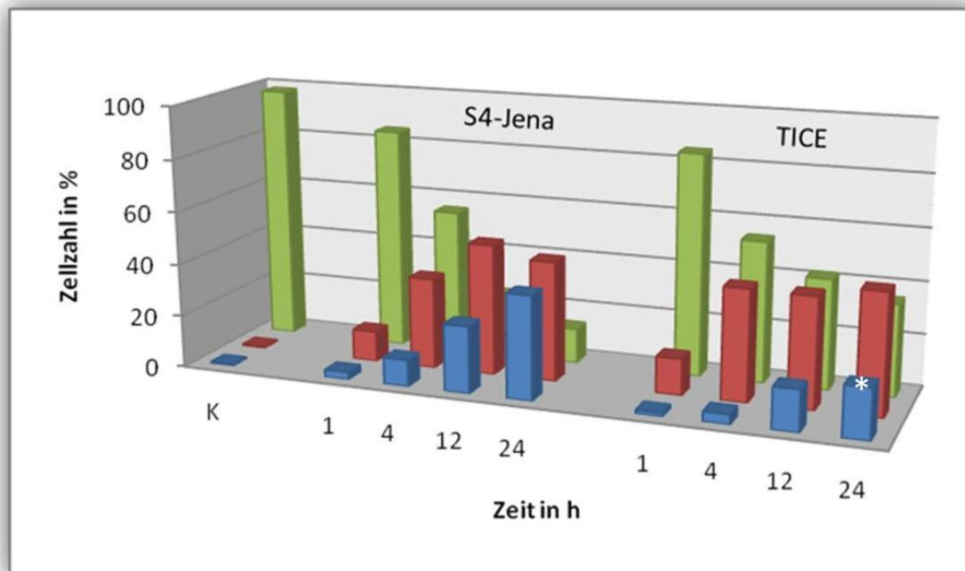


Abbildung 19: Adhärenz- und Internalisierungsverhalten von lebenden S4 Jena und TICE nach Exposition von Cal29 Zellen.

Durchflusszytometrische Analyse zum Adhärenz- und Internalisierungsverhalten der lebenden S4 Jena und TICE nach Exposition der Cal29 Zellen. Abgebildet sind die Mittelwerte sechs unabhängiger Experimente. grün: ohne BCG; rot: Zellen mit adhären BCG; blau: Zellen mit internalisierten BCG, *: $p < 0,05$.

Es konnte kein Unterschied zwischen der Exposition von Cal29 Zellen mit abgetöteten oder mit lebenden S4-Jena festgestellt werden. Im Gegensatz dazu waren bei Cal29 Zellen, die mit lebenden TICE exponiert wurden, signifikant höhere Adhärenz- sowie Internalisierungsraten im Vergleich zu abgetöteten TICE nachweisbar.

Die Cal29 Zellen wiesen nach der Exposition mit dem S4-Jena Stamm morphologische Veränderungen auf. Es konnte gezeigt werden, dass S4-Jena BCG an den Cal29 Zellen adhären und internalisiert wurden (Abbildung 21). Daraufhin rundeten sich die betroffenen Zellen ab und wiesen keine Konfluenz mehr auf (Abbildung 20 A). Des Weiteren war zu erkennen, dass S4-Jena von den Cal29 Zellen durch eine Endozytose internalisiert wurde (Abbildung 20 B, Pfeil). Dabei wurden nicht nur einzelne BCG aufgenommen, sondern ganze BCG-Konglomerate (Abbildung 21). Die REM Aufnahme zeigt deutlich, dass die BCG durch die Karzinomzelle aufgenommen wurden.

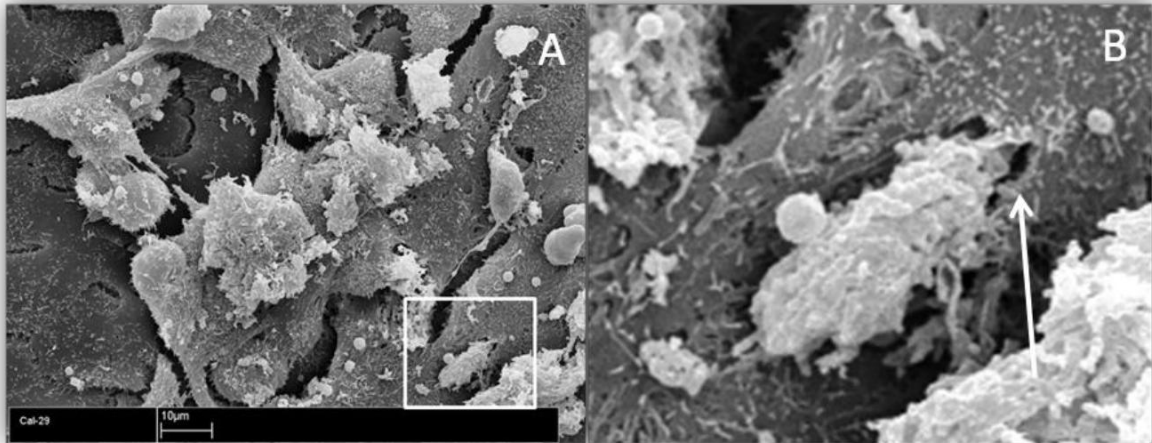


Abbildung 20: REM Aufnahme von Cal29 Zellen nach Exposition mit S4-Jena.

REM-Aufnahme der Internalisierung von lebenden S4-Jena. Cal29 Zellen wurden 12 h mit lebenden S4-Jena exponiert. A: Übersichtsaufnahme der exponierten Zellen. B: Detailaufnahme der Internalisierung. Messbalken 10 µm

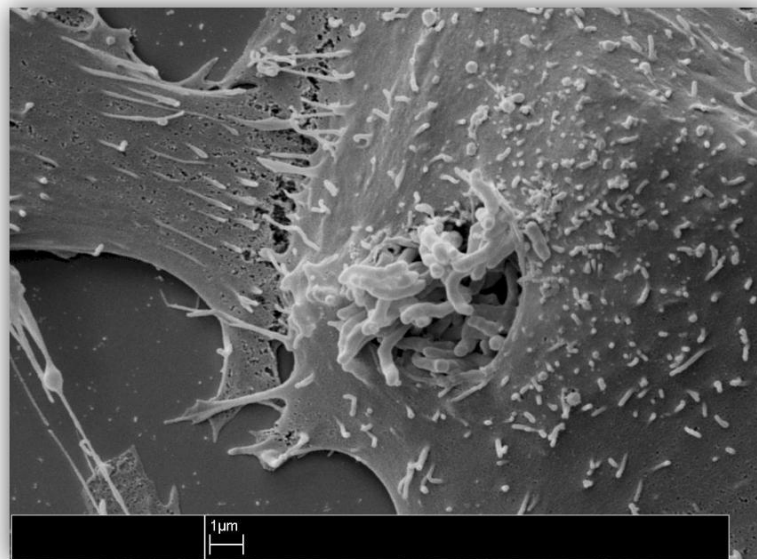


Abbildung 21: REM Aufnahme von Cal29 Zellen nach Exposition mit S4-Jena.

REM Aufnahme der Internalisierung von BCG S4-Jena in Cal29 Zellen 24 h nach Exposition. Endozytose eines BCG-Konglomerates; Messbalken: 1 µm

Im Vergleich zu mit S4-Jena exponierten Zellen sieht man in den REM Aufnahmen nur vereinzelte Cal29 Zellen, an denen TICE adhärten (Abbildung 22 A). Diese Zellen zeigten keine morphologischen Veränderungen im Vergleich zu nicht exponierten Zellen. Anhand der REM Aufnahmen konnten die durchflusszytometrischen Analysen bestätigt werden, dass nur vereinzelte TICE an den Cal29 Zellen adhärten.

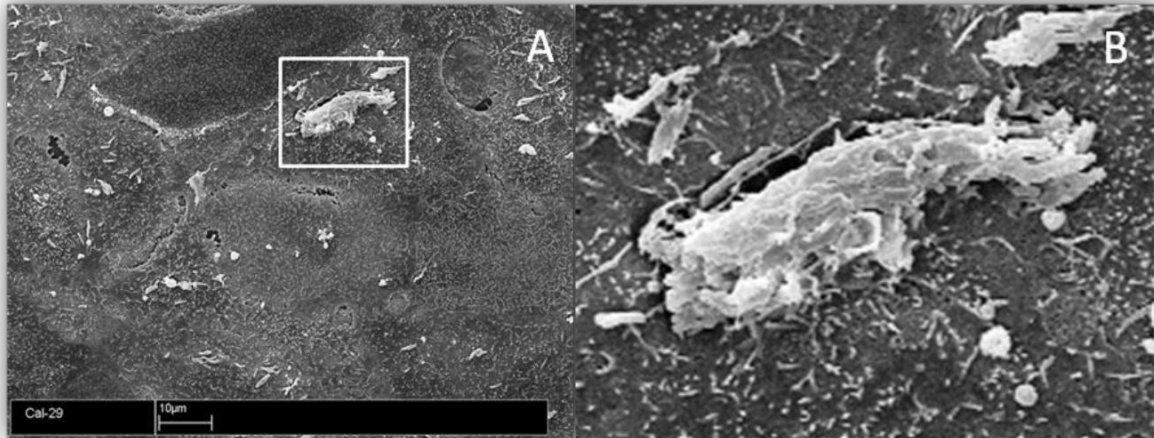


Abbildung 22: REM Aufnahme von Cal29 Zellen nach Exposition mit TICE.

REM-Aufnahme der Internalisierung von lebenden TICE. Cal29 Zellen wurden 12 h mit lebenden TICE exponiert. A: Übersichtsaufnahme der exponierten Zellen. B: Detailaufnahme der Internalisierung. Messbalken: 10 µm

3.5 Einfluss der Exposition mit S4-Jena und TICE auf das Proliferationsverhalten von T24 und Cal29

In dieser Versuchsreihe sollte die Auswirkung der Exposition mit den BCG Stämmen S4-Jena und TICE auf die Proliferation der Harnblasenkarzinomzelllinien T24 und Cal29 untersucht werden. Dafür wurden die Zellen mit den BCG Stämmen exponiert und zu verschiedenen Zeitpunkten die Proliferation mit Hilfe des mitochondrialen Toxizitätstests WST-1 untersucht. Hierfür wurden die Zellen zu den entsprechenden Zeitpunkten mit 10 µl WST-1 versetzt und nach einer Inkubationszeit von 1,5 h der Tetrazoliumumsatz mittels ELISA-reader gemessen. Anschließend wurde die Proliferationsdifferenz behandelter und unbehandelter Zellen graphisch in einer Zeitreihe verglichen.

3.5.1 Effekt der S4-Jena und TICE Exposition auf das Proliferationsverhalten von T24 Zellen

Nach Exposition mit abgetöteten S4-Jena oder TICE wurde die Proliferation nach 1 h im Vergleich zu Kontrollzellen um ca. 20 % gehemmt (Abbildung 23). Nach 24 h kam es zu einer signifikant stärkeren Hemmung der Proliferation mit abgetöteten TICE im Vergleich zur Exposition mit abgetöteten S4-Jena. Im weiteren Zeitverlauf von 96 h sank die Proliferationsrate nach Exposition mit abgetöteten S4 Jena um 63 % und mit abgetöteten TICE um 54 %.

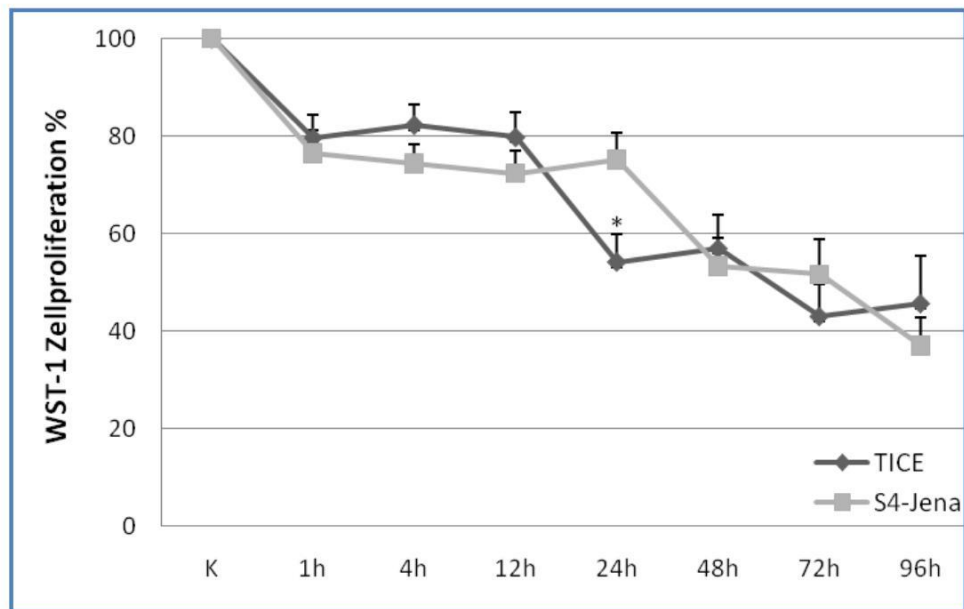


Abbildung 23: Effekt der Exposition mit abgetöteten S4-Jena bzw. TICE auf die Proliferation der T24 Zellen.

Kinetik der Proliferation der T24 Zellen nach Exposition mit abgetöteten S4-Jena und TICE. Gezeigt sind die Differenzen der Proliferationsraten zwischen exponierten Zellen und Kontrollzellen. Zu jedem gemessenen Zeitpunkt wurden die Kontrollzellen auf 100 % normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte plus Standardfehler aus zehn unabhängigen Experimenten. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$.

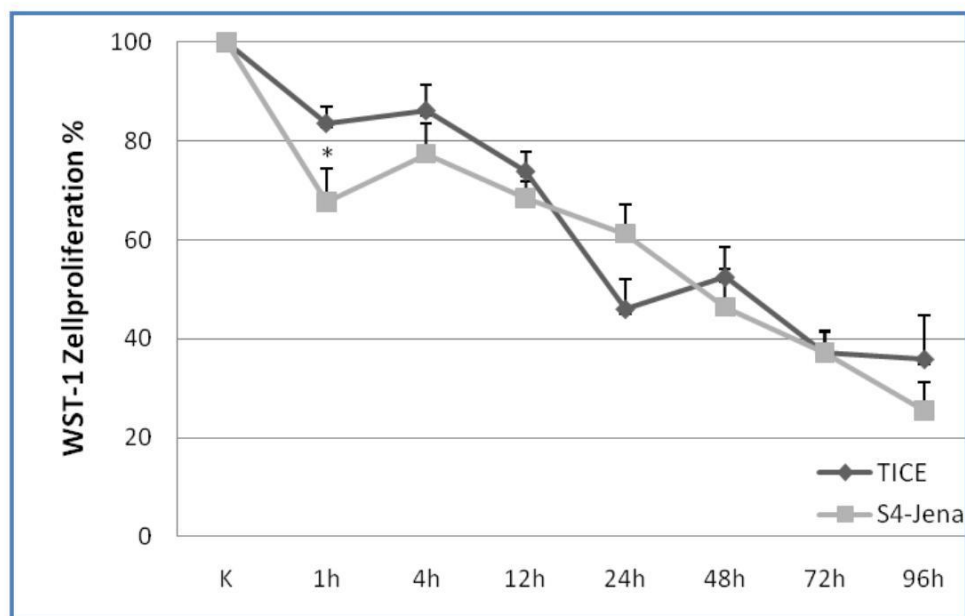


Abbildung 24: Effekt der Exposition mit lebenden S4-Jena bzw. TICE auf die Proliferation der T24 Zellen.

Kinetik der Proliferation der T24 Zellen nach Exposition mit lebenden S4-Jena und TICE. Gezeigt sind die Differenzen der Proliferationsraten zwischen exponierten Zellen und Kontrollzellen. Zu jedem gemessenen Zeitpunkt wurden die Kontrollzellen auf 100 % normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte plus Standardfehler aus zehn unabhängigen Experimenten. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$.

Die Exposition mit den lebenden S4-Jena oder TICE führte bei den T24 Zellen über einen Zeitraum von 96 h zu einer Proliferationshemmung der T24 Zellen um 74 % (S4-Jena) und 64 % (TICE) (Abbildung 24). Die Exposition mit lebenden S4-Jena erreichte nach 1 h im

Vergleich zur Exposition mit lebenden TICE eine signifikante Proliferationshemmung der T24 Zellen.

3.5.2 Effekt der S4-Jena und TICE Exposition auf das Proliferationsverhalten von Cal29 Zellen

Abgetötete TICE Bakterien wie auch abgetötete Bakterien des S4-Jena Stammes führten bei den Cal29 Zellen über einen Zeitraum von 48 h zu einer Hemmung der Proliferation um bis zu 30 % (Abbildung 25). Jedoch stieg nach 72 h die Proliferationsrate nach Exposition mit TICE wieder auf das Niveau von nichtexponierten Zellen an. Im Vergleich dazu blieb die Proliferationshemmung der mit S4-Jena exponierten Zellen im Zeitraum von 72 h annähernd konstant um ca. 20 % gesenkt und sank nach 96 h um 35 %. Nach 72 h sowie 96 h konnte eine hoch signifikante Proliferationshemmung der Cal29 Zellen nach Exposition mit abgetöteten S4-Jena im Vergleich zu TICE verzeichnet werden.

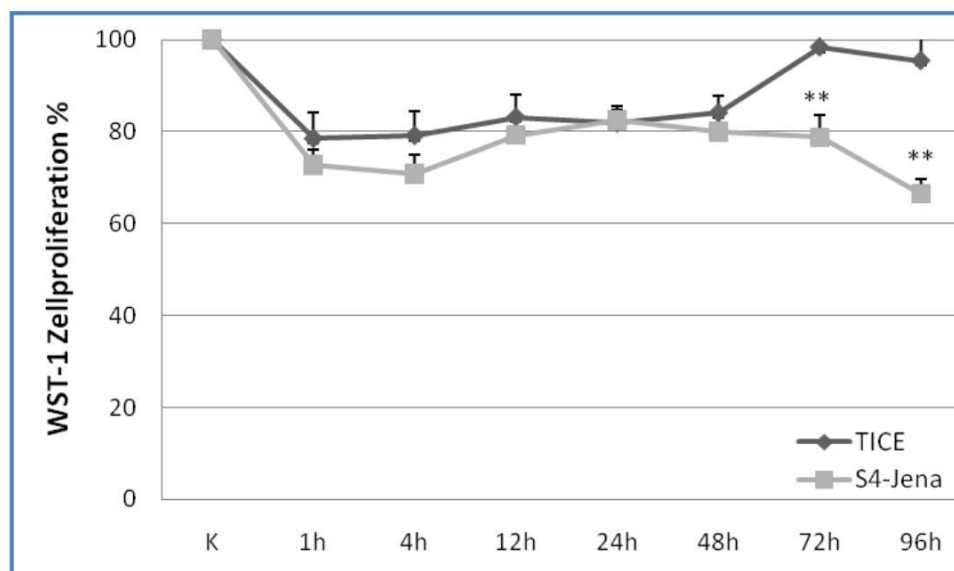


Abbildung 25: Effekt der Exposition mit abgetötete S4-Jena bzw. TICE auf die Proliferation der Cal29 Zellen.

Kinetik der Proliferation der Cal29 Zellen nach Exposition mit abgetöteten S4-Jena und TICE. Gezeigt sind die Differenzen der Proliferationsraten zwischen exponierten Zellen und Kontrollzellen. Zu jedem gemessenen Zeitpunkt wurden die Kontrollzellen auf 100 % normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte plus Standardfehler aus zehn unabhängigen Experimenten. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$.

Bereits 1 h und 4 h nach Exposition mit lebenden S4-Jena kam es, im Vergleich zur Exposition mit lebenden TICE, bereits zu einer Proliferationshemmung der Cal29 Zellen um 19 %. Die Exposition mit lebenden S4-Jena führte im Vergleich zur Exposition mit lebenden TICE zu einer signifikant stärkeren Proliferationshemmung nach 1 h, 4 h, 12 h und 72 h. Die Proliferationsrate stieg im Zeitraum von 72 h nach S4-Jena Exposition wieder auf 80 % von Kontrollzellen an. Erst nach 96 h sank die Proliferationsrate wieder auf 60 % der Proliferation von Kontrollzellen. Im Vergleich dazu sank die Proliferationsrate nach Exposition mit lebenden TICE über den gesamten Zeitraum nie unter 84 %.

Nach Exposition mit lebenden S4-Jena und TICE zeigten die Cal29 Zellen eine Hemmung der Proliferation im Vergleich zu Kontrollzellen (Abbildung 26).

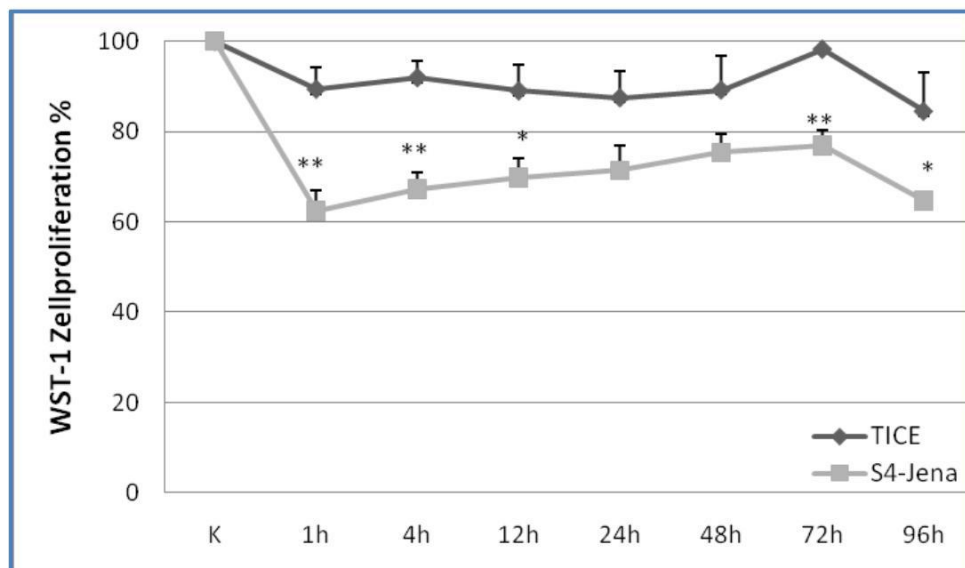


Abbildung 26: Effekt der Exposition mit lebenden S4-Jena bzw. TICE auf die Proliferation der Cal29 Zellen. Kinetik der Proliferation der Cal29 Zellen nach Exposition mit lebenden S4-Jena und TICE. Gezeigt sind die Differenzen der Proliferationsraten zwischen exponierten Zellen und Kontrollzellen. Zu jedem gemessenen Zeitpunkt wurden die Kontrollzellen auf 100 % normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte plus Standardfehler aus zehn unabhängigen Experimenten. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$.

Die Exposition mit lebenden zeigte im Vergleich zu abgetöteten S4-Jena eine annähernd gleiche Proliferationshemmung der Cal29 Zellen. Der Vergleich von lebenden und abgetöteten TICE zeigte jedoch, dass die abgetöteten TICE über einen Zeitraum von 48 h die Proliferation um 20 % hemmten gegenüber 10 % mit lebenden TICE.

3.6 Einfluss der Exposition mit S4-Jena und TICE auf den Zellzyklus von T24 und Cal29 Zellen

Eine verminderte Proliferationsrate kann zum einen durch Hemmung der Zellzyklusprogression und zum anderen durch die Induktion von Apoptose verursacht werden. In den nachfolgenden Experimenten wurde daher untersucht, inwieweit die durch die beiden BCG Stämme verursachte Proliferationshemmung auf Apoptose und/oder auf eine Zellzyklusblockade in den exponierten Harnblasenkarzinomzelllinien zurückzuführen ist. Dies wurde mit den folgenden Methoden analysiert.

Anhand der Gensignatur, die mittels Mikroarray erhalten wurde, konnten zellzyklusrelevante Gene mit Hilfe der Ingenuity Software erfasst werden. Dabei wurde in dieser Arbeit besonders auf die Gene geachtet, die für die G1/S-Checkpoint Regulation und die G2/M-Checkpoint Regulation relevant sind. Die Genexpressionsanalyse spiegelte nur bedingt die Zellzyklusphasen wieder, in der sich die Zellen befanden. Um eine quantitative Phaseneinteilung zu erhalten, wurden Zellzyklusanalysen mit Hilfe der Nicoletti-Methode der einzelnen Zellen durchgeführt. Darüber hinaus erlaubte diese Methode, eine erste Aussage über Zellen zu treffen, die sich in Apoptose befinden. Bei apoptotischen Zellen wird DNA frei gesetzt, wodurch der DNA-Gehalt in den Kernen niedriger ist als der in normalen Zellen. Diese apoptotischen Zellen erscheinen in der durchflusszytometrischen Analyse als separater SubG1-Phasenpeak und besitzen einen hypodiploiden Zellkern.

3.6.1 Effekt der S4-Jena und TICE Exposition auf den Zellzyklus von T24 Zellen

G1/S Checkpoint

Nach Exposition der T24 Zellen sowohl mit lebenden als auch mit abgetöteten S4-Jena (Abbildung 27) und TICE BCG (Abbildung 28) sank die Expression des CDK4/6 Genkomplexes signifikant. Dieser Komplex ist essentiell für den Übergang der G0-Phase in die G1-Phase. Ebenfalls wird dadurch der Übergang von der G1-Phase zur S-Phase gehemmt und daraus resultierend die DNA-Synthese verhindert. Die Exposition mit dem S4-Jena Stamm resultierte in einem signifikanten Anstieg der TGF- β II/III Genexpression, was zusätzlich einen Zellzyklusarrest in der G1/S-Phase zur Folge hat¹¹⁵. Auffällig war, dass nach der Exposition mit S4-Jena die Expression der Gene p27^{Kip1} und Rb ebenfalls

signifikant sank (Abbildung 27). Von den Genen des Transkriptionsfaktor-E2F-Komplexes stieg die Expression des E2F1 Gens nach Exposition mit S4-Jena und sank nach Exposition mit TICE. Im Gegensatz dazu sank die Genexpression von E2F3 und E2F5 nach Exposition mit beiden BCG Stämmen, wobei nur beim S4-Jena Stamm eine Signifikanz erreicht wurde.

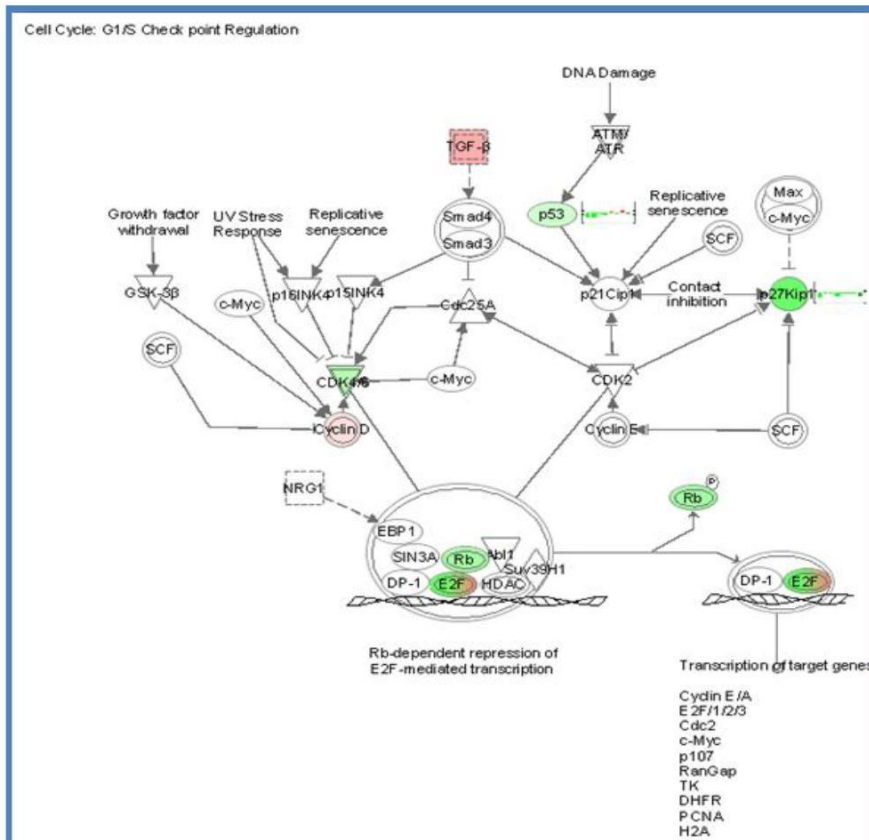


Abbildung 27: Zellzyklus G1/S Checkpoint-Signalweg (Ingenuity-Software) nach Exposition von T24 Zellen mit S4-Jena.

Die Gene sind entsprechend ihrer log ratio Genexpressions Values zwischen BCG exponierten Zellen und Kontrollzellen farbig unterlegt. rote Gensymbole: Ansteigen der Genexpression; grüne Gensymbole: Absinken der Genexpression.

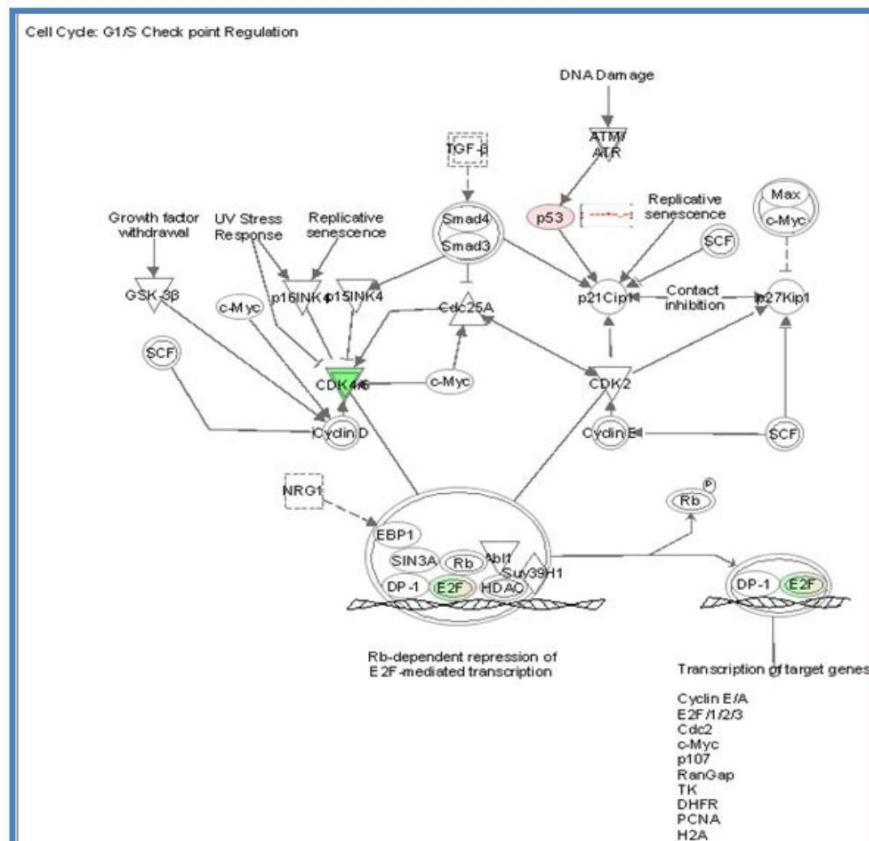


Abbildung 28: Zellzyklus G1/S Checkpoint-Signalweg (Ingenuity-Software) nach Exposition von T24 Zellen mit TICE.

Die Gene sind entsprechend ihrer log ratio Genexpressions Values zwischen BCG exponierten Zellen und Kontrollzellen farbig unterlegt. rote Gensymbole: Ansteigen der Genexpression; grüne Gensymbole: Absinken der Genexpression.

G2/M Checkpoint

Die Genexpressionsanalyse des G2/M-Checkpoints zeigte, dass die Exposition der T24 Zellen mit S4-Jena zu einer verminderten Expression der Gene p53 und GADD45A führte (Abbildung 29). Ausschließlich nach Exposition mit abgetöteten S4-Jena stieg die Genexpression von MDM2 signifikant an. Im Vergleich dazu stieg nach Exposition mit lebenden TICE die Genexpression von p53 (Abbildung 30).

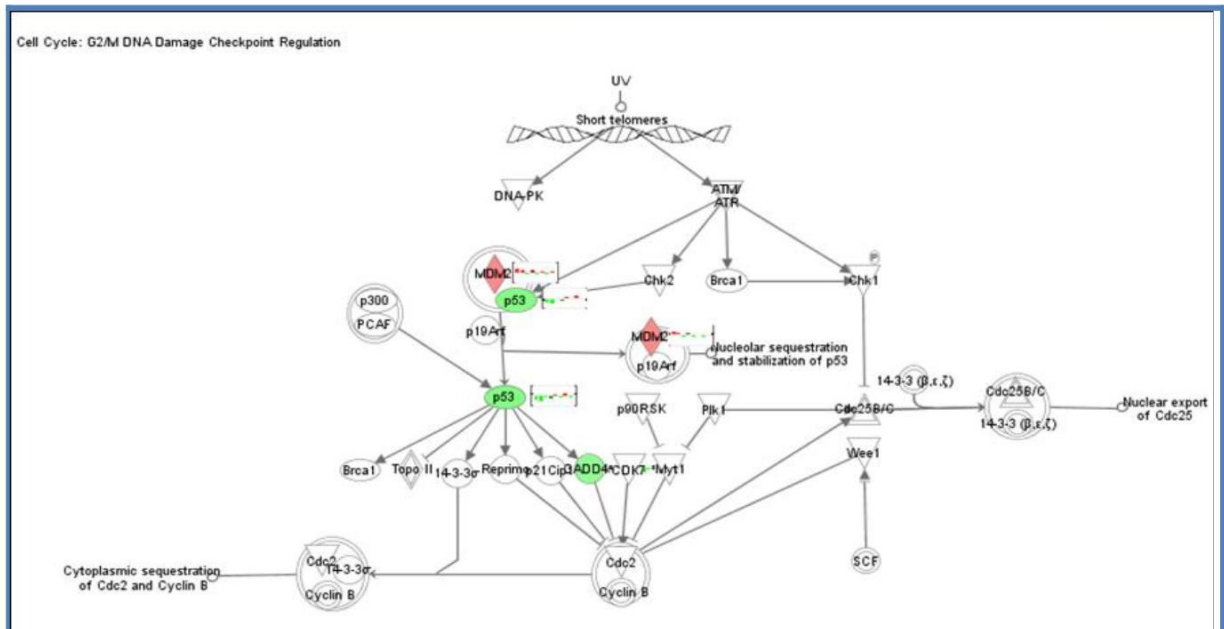


Abbildung 29: Zellzyklus G2/M Checkpoint-Signalweg (Ingenuity-Software) nach Exposition von T24 Zellen mit S4-Jena.

Die Gene sind entsprechend ihrer log ratio Genexpressions Values zwischen BCG exponierten Zellen und Kontrollzellen farbig unterlegt. rote Gensymbole: Ansteigen der Genexpression; grüne Gensymbole: Absinken der Genexpression.

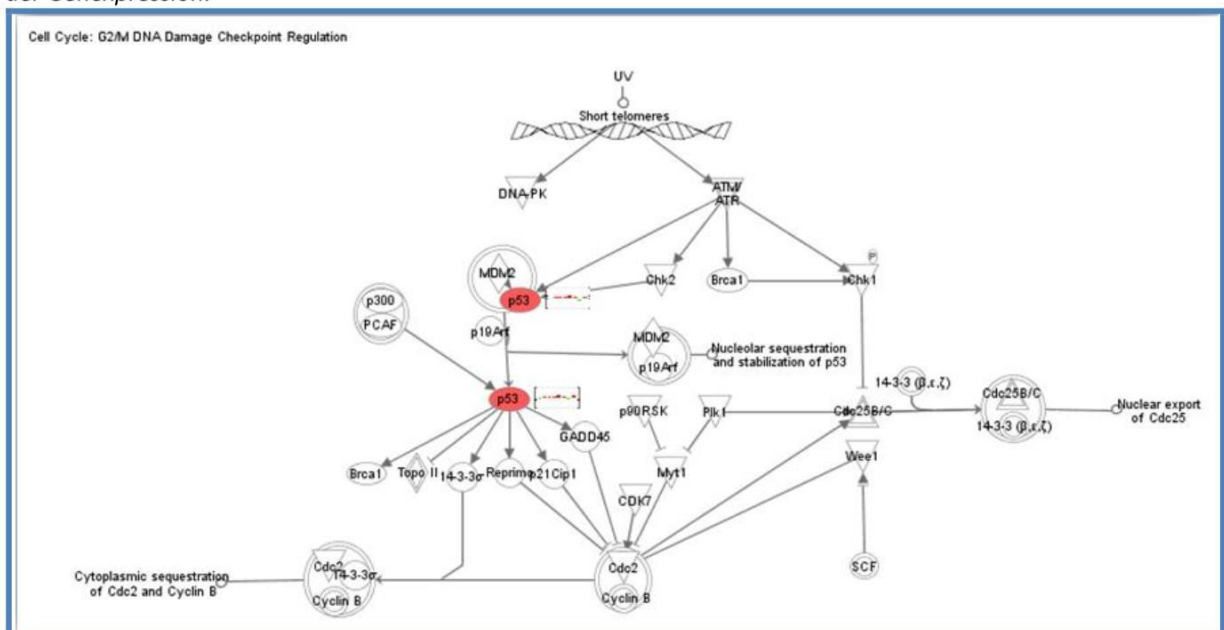


Abbildung 30: Zellzyklus G2/M Checkpoint-Signalweg (Ingenuity-Software) nach Exposition von T24 Zellen mit TICE.

Die Gene sind entsprechend ihrer log ratio Genexpressions Values zwischen BCG exponierten Zellen und Kontrollzellen farbig unterlegt. rote Gensymbole: Ansteigen der Genexpression; grüne Gensymbole: Absinken der Genexpression.

3.6.2 Durchflusszytometrische Analyse des Zellzyklus von T24 Zellen nach Exposition mit S4-Jena und TICE

Um zu untersuchen, welche Auswirkungen die Exposition mit den BCG Stämmen auf den Zellzyklus von T24 Zellen hatte, wurden diese für 4 h, 12 h bzw. 24 h mit den beiden Stämmen exponiert. Anschließend wurden die Zellen entsprechend Kapitel 2.5.2 mit Propidiumiodid (PI) markiert und eine Zellzyklusanalyse durchgeführt.

Nach 4-stündiger Exposition mit BCG erhöhte sich bereits der Anteil der Zellen in der SubG1-Phase auf 16 % bei abgetöteten und 26 % bei lebenden S4-Jena im Vergleich zu 6 % der Kontrollzellen (Abbildung 31). Im weiteren Verlauf kam es nach 12 h Exposition mit S4-Jena zu einem signifikanten Anstieg (22 % abgetötete S4-Jena, 21 % lebende S4-Jena) der Zellen, welche in der SubG1-Phase nachweisbar waren. Gleichzeitig konnte eine simultane Verminderung (18 % abgetöteten S4-Jena, 20 % lebenden S4-Jena) der Zellen, die sich in der G2/M-Phase befanden, im Vergleich mit den Kontrollzellen (31 %) nachgewiesen werden. Noch ausgeprägter waren diese Veränderungen nach 24-stündiger Exposition mit S4-Jena zu beobachten. Die Analyse der Daten zeigte eine Erhöhung des Anteils der Zellen, die sich in der SubG1-Phase befanden, auf 23 % nach Exposition mit abgetöteten S4-Jena und auf 28 % nach Exposition mit lebenden S4-Jena. Entsprechend verminderte sich der Anteil der Zellen in der G2/M-Phase auf 17 % (abgetötete S4-Jena) bzw. 18 % (lebende S4-Jena). Der Anteil der Zellen, die sich in der S-Phase bzw. in der G0/G1-Phase befanden, verringerte sich nur gering während des Expositionszeitraumes von 24 h. Es konnten keine relevanten Veränderungen der Zellen in der S-Phase über den 24-stündigen Expositionszeitraum mit abgetöteten oder lebenden S4-Jena beobachtet werden.

Die Exposition der T24 Zellen mit abgetöteten TICE führte über 24 h zu keiner Änderung der Zellen in der G0/G1-Phase und der Zellen in der G2/M-Phase (Abbildung 32). Parallel dazu führte die Exposition mit abgetöteten TICE zu keiner deutlichen Erhöhung der Zellen in der SubG1-Phase. Dagegen kam es zu einer Abnahme der Zellen in der G0/G1-Phase nach Exposition mit lebenden TICE. Jedoch war nach 24 h Exposition mit lebenden TICE eine Verdopplung der Zellzahl in der SubG1-Phase zu verzeichnen. Nach Exposition mit abgetöteten und lebenden TICE kam es zu keiner signifikanten Veränderung der Zellzahl in der S-Phase.

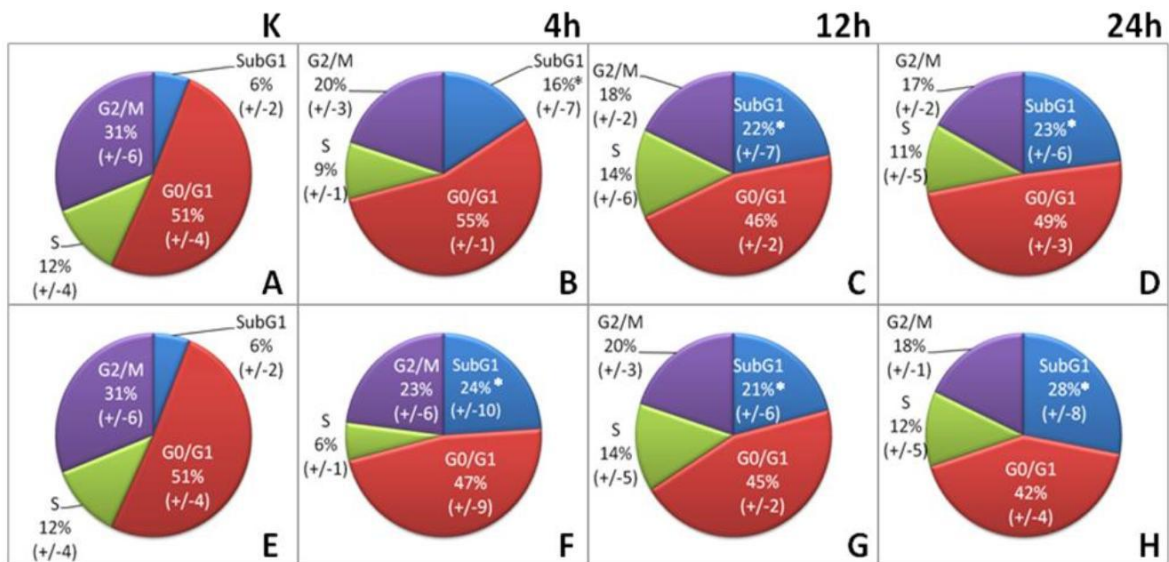


Abbildung 31: Durchflusszytometrische Analyse des Zellzyklus nach Exposition der T24 Zellen mit S4-Jena. Zellzyklusanalyse von T24 Zellen nach Exposition mit lebenden und abgetöteten S4-Jena über einen Zeitraum von 24 h. A, E: Kontrolle, B - D: abgetötete S4-Jena, F - H lebende S4-Jena. Die Grafiken zeigen jeweils die Mittelwerte aus sechs unabhängigen Experimenten. Angabe des prozentualen Anteils von Zellen in G0/G1 (rot), S (grün), G2/M (lila) und SubG1 (blau) als Mittelwert \pm Standardfehler. *: $p < 0,05$

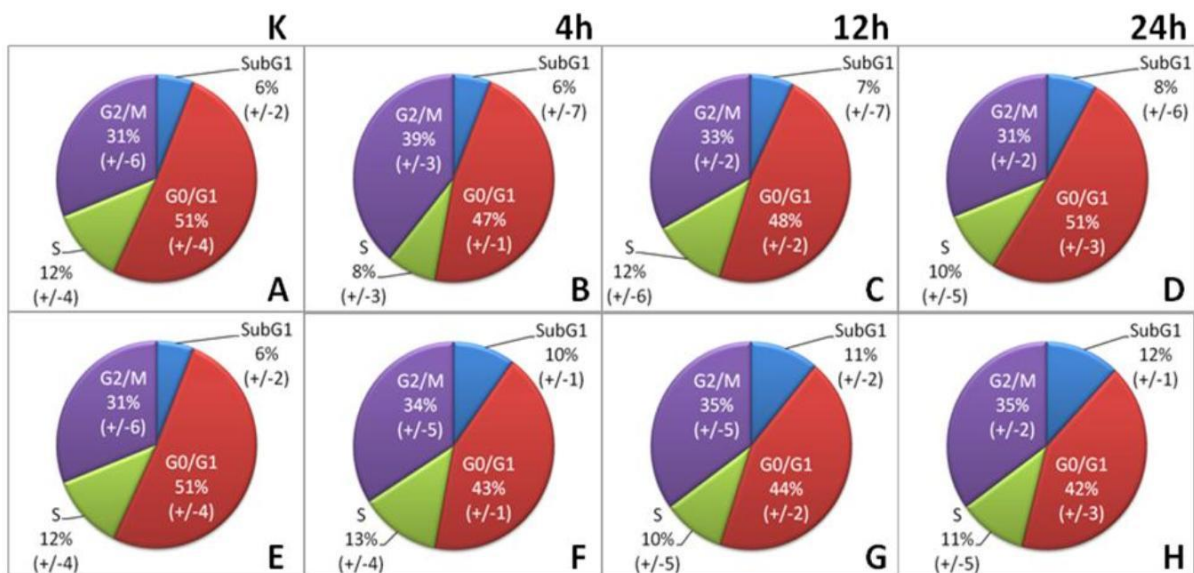


Abbildung 32: Durchflusszytometrische Analyse des Zellzyklus nach Exposition der T24 Zellen mit TICE. Zellzyklusanalyse von T24 Zellen nach Exposition mit lebenden und abgetöteten TICE über einen Zeitraum von 24 h. A, E: Kontrolle, B - D: abgetötete TICE, F - H lebende TICE. Die Grafiken zeigen jeweils die Mittelwerte aus sechs unabhängigen Experimenten. Angabe des prozentualen Anteils von Zellen in G0/G1 (rot), S (grün), G2/M (lila) und SubG1 (blau) als Mittelwert \pm Standardfehler. *: $p < 0,05$

3.6.3 Effekt der S4-Jena und TICE Exposition auf den Zellzyklus von Cal29 Zellen

G1/S Checkpoint

Im Gegensatz zu den T24 Zellen (Kapitel 3.6.1) kam es bei den Cal29 Zellen nach Exposition mit TICE zu einer erhöhten Expressionsrate des CyclinD1/Cdk4 Komplexes (Abbildung 31). Gleichzeitig stieg die Genexpression des Gegenspielers p21^{cip1}. Dadurch

wurde wieder ein Gleichgewicht erreicht. Die Genexpression des Gens Cdk6 sank jedoch über den gesamten Expositionszeitraum. Im Vergleich dazu sank nach Exposition mit S4-Jena die Genexpression von p21^{cip1} (Abbildung 33). Der Cdk4/6 Komplex war nach Exposition mit S4-Jena nicht signifikant beeinflusst, es kam lediglich zu einer geringen Senkung der Genexpression. Bei beiden Stämmen kam es zu einer Senkung der Genexpression des TGF- β I/II Komplexes und einer Steigerung der Genexpression des Transkriptions-E2F-Komplexes.

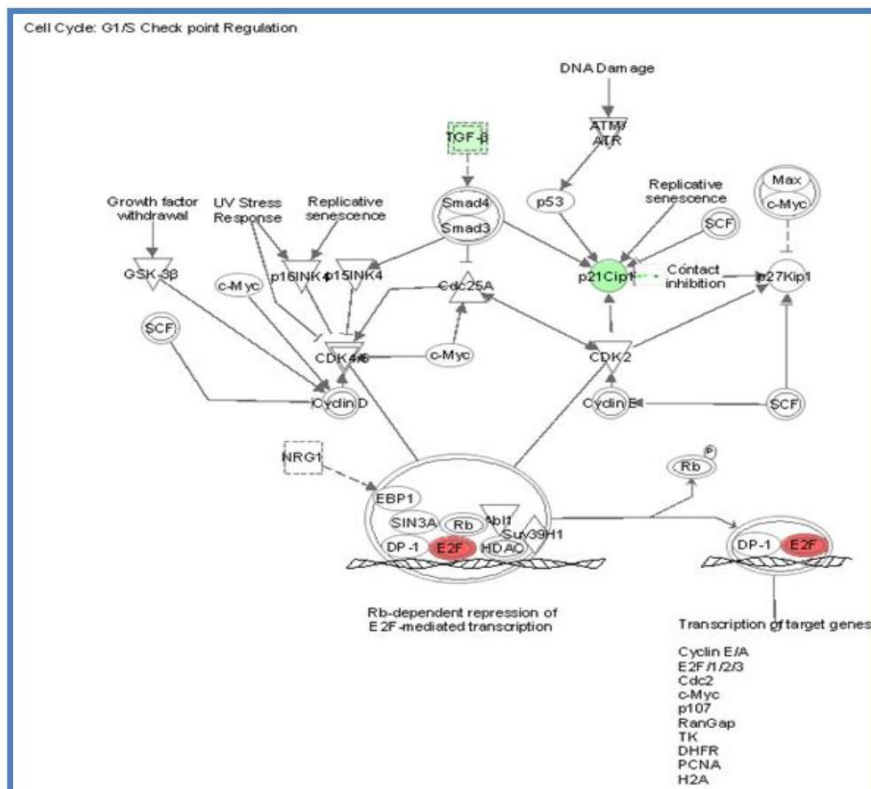


Abbildung 34: Zellzyklus G1/S Checkpoint-Signalweg (Ingenuity-Software) nach Exposition von Cal29 Zellen mit S4-Jena.

Die Gene sind entsprechend ihrer log ratio Genexpressions Values zwischen BCG infizierten Zellen und Kontrollzellen farbig unterlegt. rote Gensymbole: Ansteigen der Genexpression; grüne Gensymbole: Absinken der Genexpression.

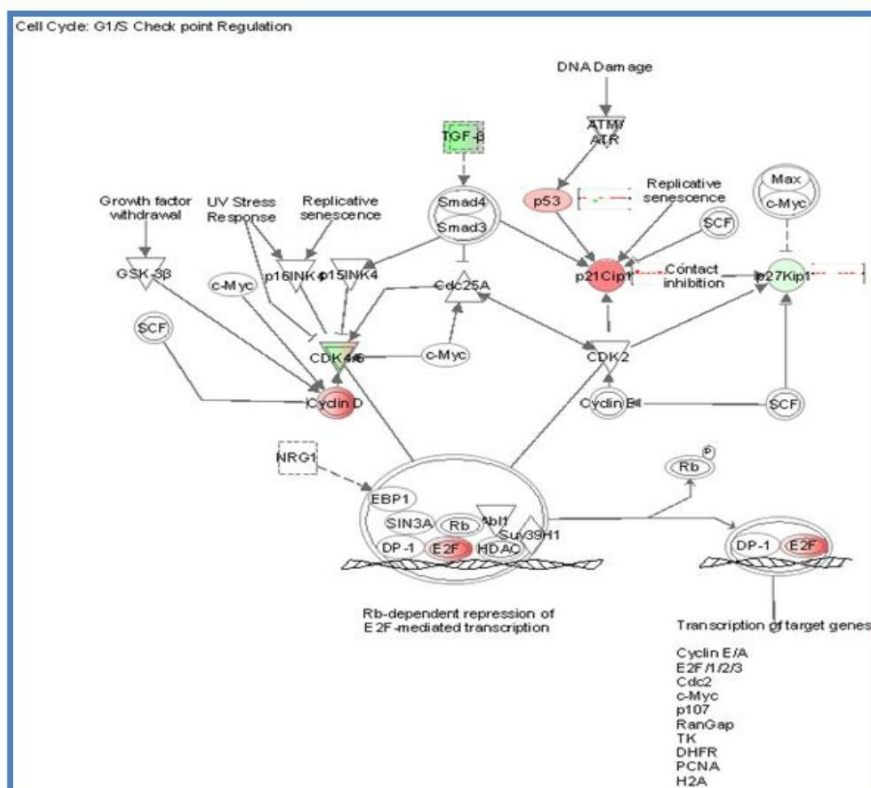


Abbildung 33: Zellzyklus G1/S Checkpoint-Signalweg (Ingenuity-Software) nach Exposition von Cal29 Zellen mit TICE.

Die Gene sind entsprechend ihrer log ratio Genexpressions Values zwischen BCG infizierten Zellen und Kontrollzellen farbig unterlegt. rote Gensymbole: Ansteigen der Genexpression; grüne Gensymbole: Absinken der Genexpression.

G2/M Checkpoint

Bei dem Zellzyklus Checkpoint G2/M wurden nach Exposition mit TICE die Gene MDM2 runter reguliert und GADD45A hoch reguliert. Das Gen p21 wurde nach Exposition mit TICE hoch reguliert und nach Exposition mit S4-Jena runter reguliert.

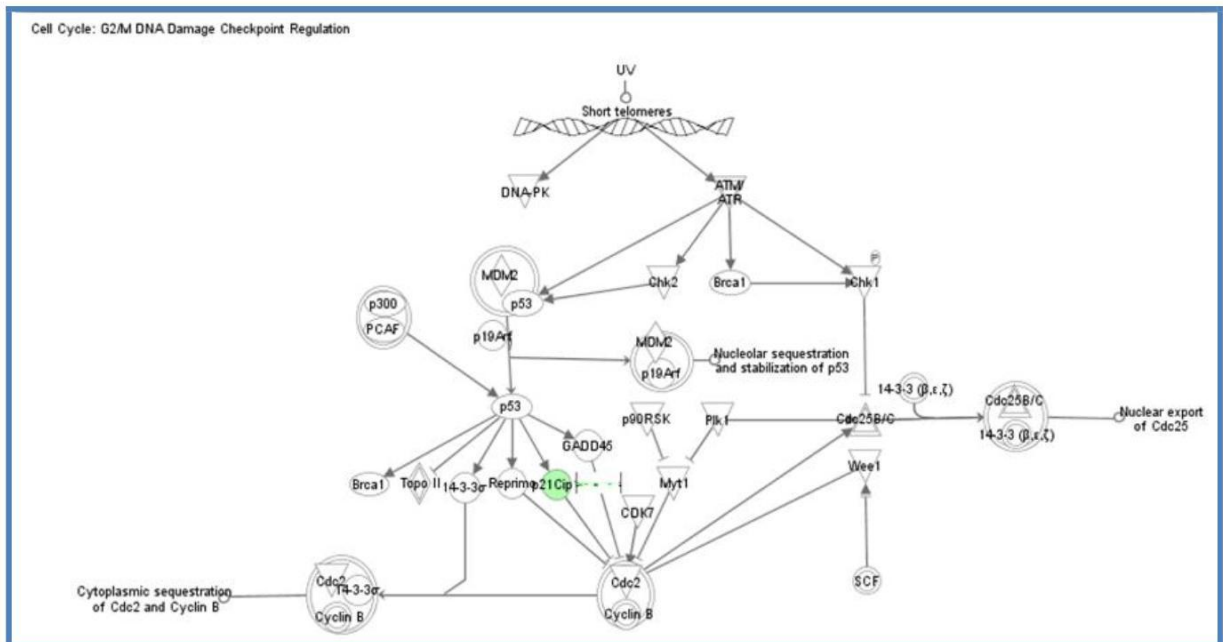


Abbildung 35: Zellzyklus G2/M Checkpoint-Signalweg (Ingenuity-Software) nach Exposition von T24 Zellen mit S4-Jena.

Die Gene sind entsprechend ihrer log ratio Genexpressions Values zwischen BCG exponierten Zellen und Kontrollzellen farbig unterlegt. rote Gensymbole: Ansteigen der Genexpression; grüne Gensymbole: Absinken der Genexpression.

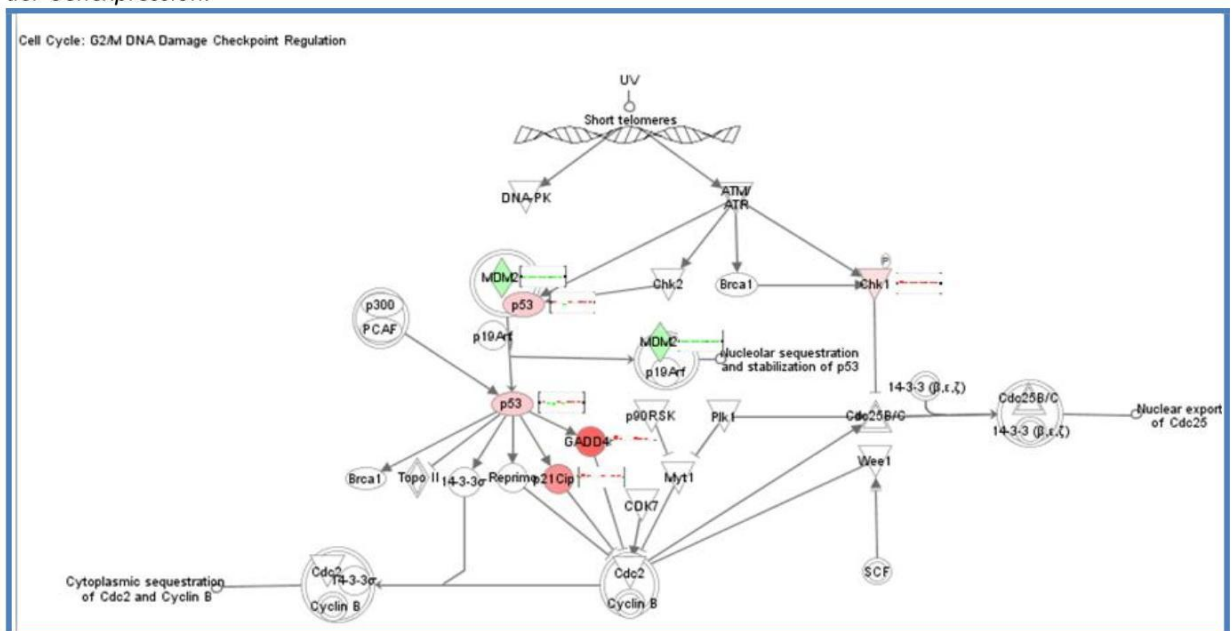


Abbildung 36: Zellzyklus G2/M Checkpoint-Signalweg (Ingenuity-Software) nach Exposition von Cal29 Zellen mit TICE.

Die Gene sind entsprechend ihrer log ratio Genexpressions Values zwischen BCG exponierten Zellen und Kontrollzellen farbig unterlegt. rote Gensymbole: Ansteigen der Genexpression; grüne Gensymbole: Absinken der Genexpression.

Durchflusszytometrische Analyse des Zellzyklus von Cal29 Zellen nach Exposition mit S4-Jena und TICE

Um die Auswirkungen der Exposition mit den BCG Stämmen auf den Zellzyklus von Cal29 Zellen zu untersuchen, wurden diese für 4 h, 12 h bzw. 24 h mit beiden Stämmen exponiert. Bei den Cal29 Zellen führte die Exposition mit abgetöteten S4-Jena zu keiner deutlichen Veränderung der Zellen in der G0/G1-Phase (Abbildung 37). Dagegen war, wie schon bei der T24 Zellen zu beobachten, eine signifikante Abnahme der Zellen in der G2/M-Phase und eine signifikante Zunahme der Zellen in der SubG1-Phase zu verzeichnen. Nahezu gleiche Ergebnisse konnten nach Exposition mit lebenden S4-Jena beobachtet werden. Auch hier zeigte sich keine Veränderung in der G0/G1-Phase. Jedoch führte die Exposition zu einer signifikanten Abnahme der Zellen in der G2/M-Phase und daraus resultierte eine signifikante Zunahme der Zellen in der SubG1-Phase. Die Zellen in der S-Phase zeigten nach Exposition mit lebenden sowie abgetöteten S4-Jena keine relevante Veränderung. Die durchflusszytometrischen Analysen des Zellzyklus der mit abgetöteten oder lebenden TICE exponierten Cal29 Zellen zeigten keine relevanten Veränderungen (Abbildung 38). Über den Expositionszeitraum von 24 h konnte lediglich eine Zunahme der Zellen in der S-Phase mit simultaner Abnahme der Zellen in der G2/M-Phase verzeichnet werden. Dagegen war weder ein Anstieg apoptotischer Zellen in der SubG1-Phase noch eine Veränderung der Zellen in der G0/G1-Phase nachweisbar.

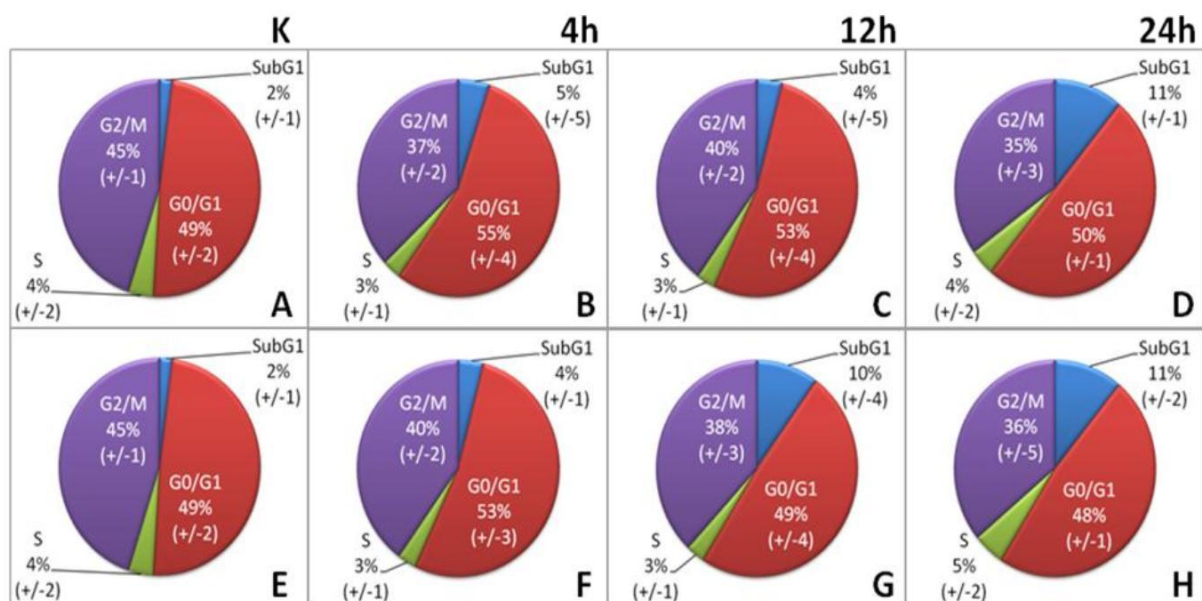


Abbildung 37: Durchflusszytometrische Analyse des Zellzyklus nach Exposition der Cal29 Zellen mit S4-Jena.

Zellzyklusanalyse von Cal29 Zellen nach Exposition mit lebenden und abgetöteten S4-Jena über einen Zeitraum von 24 h. A, E: Kontrolle, B - D: abgetötete S4-Jena, F - H lebende S4-Jena. Die Grafiken zeigen jeweils die Mittelwerte aus sechs unabhängigen Experimenten. Angabe des prozentualen Anteils von Zellen in G0/G1 (rot), S (grün), G2/M (lila) und SubG1 (blau) als Mittelwert \pm Standardfehler.

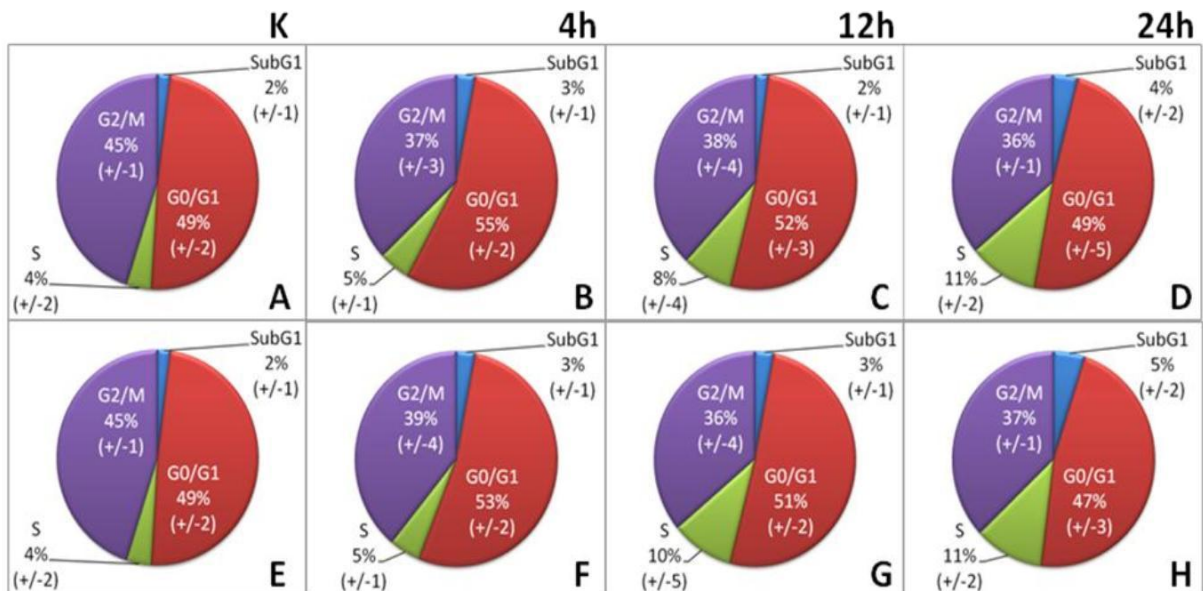


Abbildung 38: Durchflusszytometrische Analyse des Zellzyklus nach Exposition der Cal29 Zellen mit TICE.

Zellzyklusanalyse von Cal29 Zellen nach Exposition mit lebenden und abgetöteten TICE über einen Zeitraum von 24 h. A, E: Kontrolle, B - D: abgetötete TICE, F - H lebende TICE. Die Grafiken zeigen jeweils die Mittelwerte aus sechs unabhängigen Experimenten. Angabe des prozentualen Anteils von Zellen in G0/G1 (rot), S (grün), G2/M (lila) und SubG1 (blau) als Mittelwert \pm Standardfehler.

Zusammenfassend konnte somit gezeigt werden, dass Cal29 Zellen deutlich sensibler in ihrem Zellzyklus auf die Exposition von S4-Jena reagierten als auf die Exposition mit TICE. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Exposition mit den BCG Stämmen S4-Jena und TICE zu einer Abnahme der Zellen in der G2/M-Phase führten.

3.7 Einfluss der Exposition mit S4-Jena und TICE auf die Apoptose von T24 und Cal29

In den ersten Schritten einer Wirt-Bakterien-Interaktion adhären die BCG an den Zellen und werden internalisiert (Kapitel 3.4.1/2). Nachfolgend kommt es zu einer Proliferationshemmung der exponierten Zellen (Kapitel 3.5.1/2). Die Zellzyklusuntersuchungen ergaben eine Reduktion der exponierten Zellen in der G2/M-Phase im Vergleich zu nicht Kontrollzellen (Kapitel 3.6.2/4). Gleichzeitig kam es zu einem signifikanten Anstieg in der SubG1-Phase, die apoptotischen Zellen entspricht. In TICE exponierten Cal29 Zellen konnte dies nicht nachgewiesen werden. Da die Apoptose ein komplexer und in Stufen ablaufender Vorgang ist, kann man nicht zu jedem Zeitpunkt alle Phasen erfassen. Darum ist es notwendig, mehrere Methoden zum Apoptosenachweis durchzuführen. Aufgrund der bisher beschriebenen Ergebnisse wurden die Apoptoseraten nach Exposition mit den BCG Stämmen S4-Jena und TICE an

den Zelllinien T24 und Cal29 untersucht. Für die quantitative Bestimmung von apoptotischen Zellen wurden durchflusszytometrische Analysen durchgeführt. Im Stadium einer frühen Apoptose kommt es zu einem Membranflip von Phosphatidylserin an die Außenseite der Zellmembran. Dieser Flip kann mit AnnexinV detektiert werden. Die qualitative Bewertung der Apoptose wurde mittels Apoptosemarkern, wie AnnexinV und Caspase 3/7, am Laserscanning Mikroskop bestimmt. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen sollten das morphologische Bild der Apoptose bestätigen.

3.7.1 Nachweis der Apoptoseinduktion mittels Translokation von Phosphatidylserin (AnnexinV) in Verbindung mit Propidiumiodid (PI)

Während der Apoptose kommt es zu einer Fragmentierung der DNA. Apoptotische Zellen weisen daher einen geringeren DNA-Gehalt auf als Zellen, die sich in der G0/G1-Phase befinden. Diese apoptotische Phase wird als SubG1-Phase bezeichnet. Nach Exposition der T24 Zellen mit den Stämmen S4-Jena und TICE kam es in beiden Fällen zu einem signifikanten Anstieg der Zellen in der SubG1-Phase (Kapitel 3.6.2/Abbildung 31-32). Parallel zu der Nicolettimethode wurden Apoptoseuntersuchungen mittels AnnexinV und Propidiumiodid Färbung durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sollten den signifikanten Anstieg der apoptotischen T24 Zellen nach Exposition mit den Stämmen TICE und S4-Jena bestätigen.

Durchflusszytometrische Analyse der Apoptoserate von T24 Zellen nach Exposition mit S4-Jena und TICE

Unter dem Einfluss von S4-Jena ließen sich bereits nach einer Inkubationszeit von 4 h apoptotische T24 Zellen nachweisen (Abbildung 39A-B). Es zeigte sich insbesondere nach Exposition mit lebenden S4-Jena eine signifikante Abnahme der vitalen Zellpopulation in Verbindung mit einem deutlichen Anstieg des spätapoptotischen/nekrotischen Zellanteils. Nach 12 h Exposition waren zunehmend apoptotische sowie nekrotische Prozesse zu beobachten. Diese erhöhten sich auf mehr als 44 % der untersuchten Zellanzahl nach Exposition mit abgetöteten und 36 % nach Exposition mit lebenden S4-Jena. Die Abnahme der Anzahl apoptotischer Zellen nach 24 h war bedingt durch den Übergang der Zellen in das Stadium der Spätapoptose / Nekrose. Diese umfassten 51 % bei abgetöteten und 45 % der gesamten Zellpopulation nach Exposition mit lebenden S4-Jena.

T24 Zellen, welche 4 h mit TICE exponiert wurden, zeigten eine geringfügige Erhöhung des spätapoptotisch/nekrotischen Anteils und eine Verringerung der vitalen Zellpopulation (Abbildung 39C-D). Erst nach 12-stündiger Expositionszeit ließ sich bei den mit TICE exponierten Zellen eine Zunahme der spätapoptotischen/nekrotischen Zellen nachweisen. Nach 24 h konnte ein zunehmender Verlust der Membranintegrität durch einen erhöhten Anteil spätapoptotisch/nekrotischer Zellen nachgewiesen werden. Der Anteil vitaler Zellen an der gemessenen Zellpopulation umfasste nach Exposition mit abgetöteten 53 % und mit lebenden TICE 56 %. Die Zunahme des frühapoptotischen Anteils (AV⁺/PI-) fiel im Vergleich zu den Kontrollen nach Exposition mit beiden BCG Stämmen vernachlässigbar gering aus.

Durchflusszytometrische Analyse der Apoptoserate von Cal29 Zellen nach Exposition mit S4-Jena und TICE

Nach der Exposition der Cal29 Zellen mit S4-Jena konnten weder nach 12 h noch nach 24 h signifikante Effekte auf die Apoptose anhand der Quantifizierung des AnnexinV-Signals nachgewiesen werden (Abbildung 40A-B). Lediglich 24 h nach Exposition mit lebenden S4-Jena war eine Verringerung der vitalen Zellen um 11 % zu verzeichnen. Bei abgetöteten S4-Jena sanken sie um 3 %. Die Exposition der Cal29 Zellen mit TICE zeigte nach 24 h eine Reduktion der vitalen Zellen um 1 % bei abgetöteten und 5 % bei lebenden TICE (Abbildung 40 C-D).

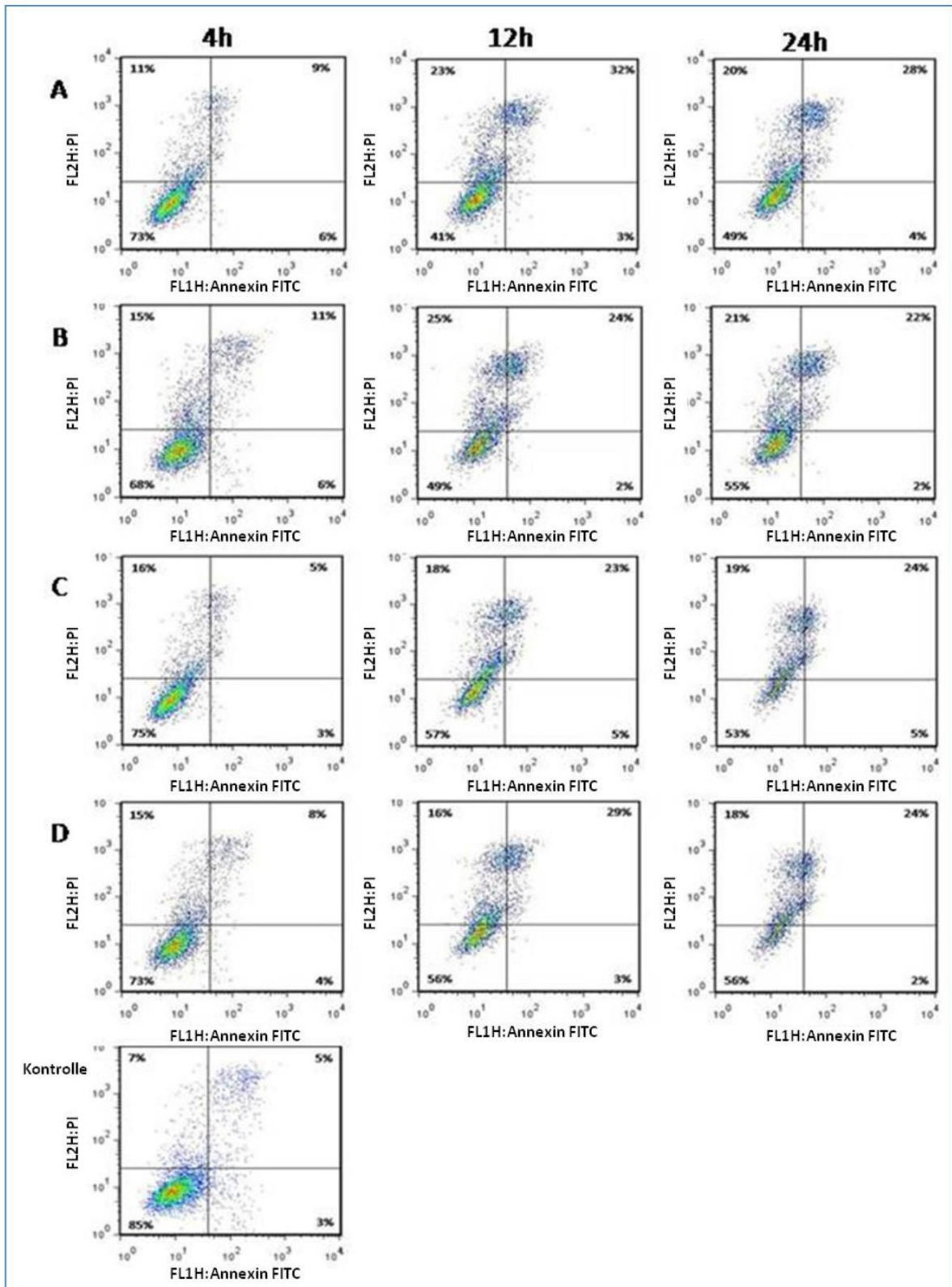


Abbildung 39: Durchflusszytometrische Analyse der Apoptoseinduktion von T24 Zellen nach Exposition mit S4-Jena und TICE.

Quadrantenanalyse der durchflusszytometrischen Messung von AnnexinV und Propidiumiodid bei T24 Zellen nach 4,-12,-24-stündiger Exposition mit S4-Jena oder TICE. A: abgetötete S4-Jena, B: lebende S4-Jena, C: abgetötete TICE, D: lebende TICE. Die Werte entsprechen den Mittelwerten von sechs unabhängigen Versuchen, * $p < 0,05$.

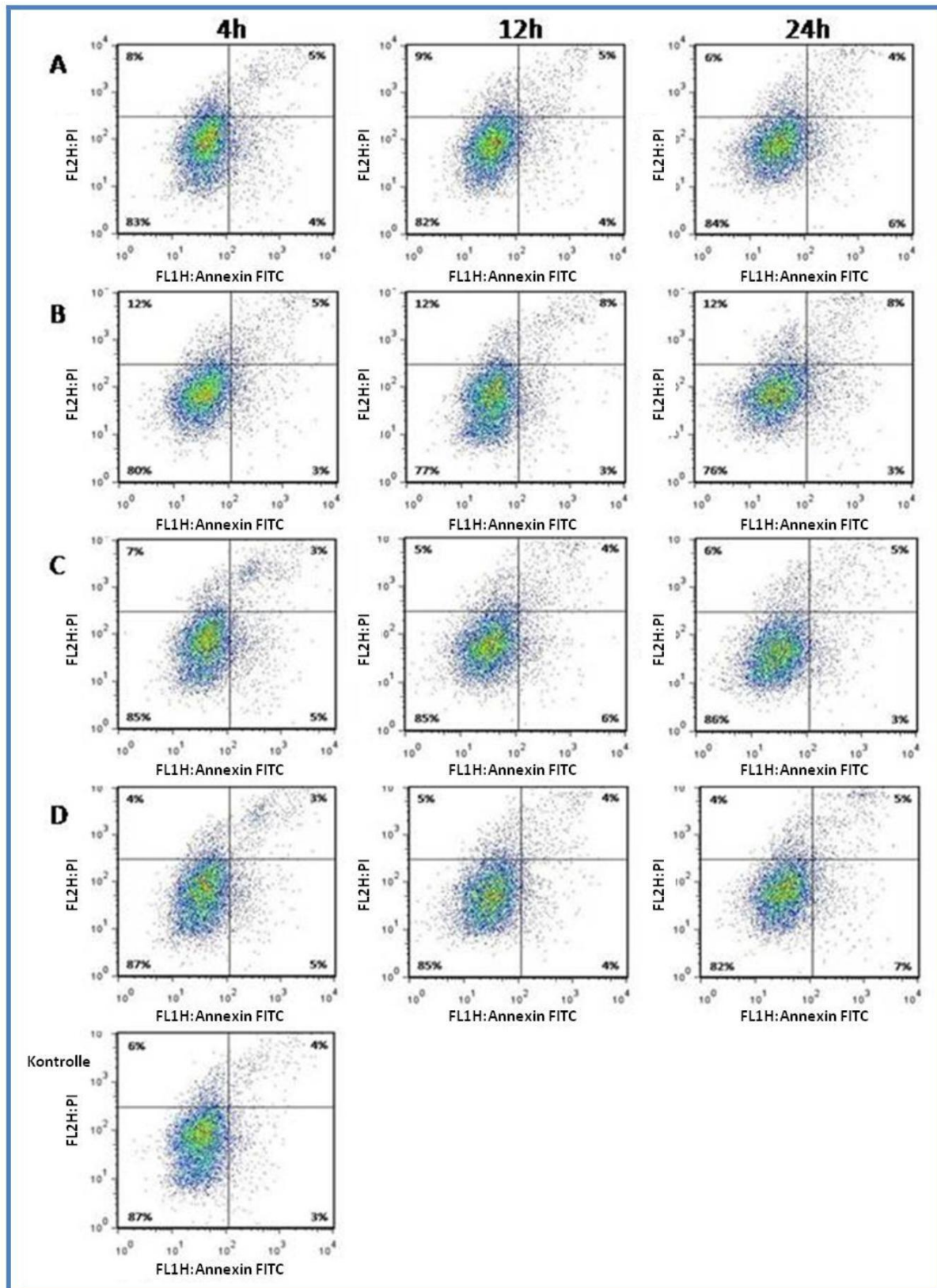


Abbildung 40: Durchflusszytometrische Analyse der Apoptoseinduktion von Cal29 Zellen nach Exposition mit S4-Jena und TICE.

Quadrantenanalyse der durchflusszytometrischen Messung von AnnexinV und Propidiumiodid bei Cal29 Zellen nach 4,-12,-24-stündiger Exposition mit S4-Jena oder TICE. A: abgetötete S4-Jena, B: lebende S4-Jena, C: abgetötete TICE, D: lebende TICE. Die Werte entsprechen den Mittelwerten von sechs unabhängigen Versuchen, * $p < 0,05$.

3.7.2 Nachweis der Apoptoseinduktion mittels Laser Scanning Mikroskopie

Anhand der Laser Scanning Mikroskopie sollten die Apoptoseergebnisse der Durchflusszytometrie nach Exposition mit den beiden BCG Stämmen bestätigt werden. Dafür wurden die Zellen in Deckglaskammern kultiviert und 24 h mit lebenden sowie abgetöteten S4-Jena und TICE exponiert. Mit Hilfe von AnnexinV wurde der PS-Flip im Laser Scanning Mikroskop visualisiert. Aktivierte Caspase 3/7 wurde anhand des Magic Red™-DEVD Tests (Roche) nachgewiesen. Die Versuche wurden an lebenden, nicht fixierten Zellen durchgeführt um die Membranintegrität zu bewahren.

LSM Untersuchungen der Apoptoserate von T24 Zellen nach Exposition mit S4-Jena und TICE

In Abbildung 41 ist beispielhaft eine Aufnahme von nicht exponierten T24 Zellen (Kontrolle) nach AnnexinV und Magicred Färbung dargestellt. Dabei ist weder ein Zeichen von früher Apoptose durch AnnexinV oder aktivierte Caspasen 3/7 nachweisbar. Dagegen zeigte die Exposition mit abgetöteten TICE einen erhöhten PS-Flip mit Caspasen 3/7 Aktivierung (Abbildung 39 A). Jedoch kann man deutlich erkennen, dass Zellen welche sich in früher Apoptose befanden, nur teilweise Caspasen 3/7 positiv waren. Dagegen führte die Exposition mit lebenden TICE zu einer geringeren AnnexinV Färbung mit verstärkter Caspasen 3/7 Aktivierung (Abbildung 41 B). Auch im Durchlichtbild sind weniger Zellen nachweisbar. Dies lässt darauf schließen, dass sich durch eine erhöhte Apoptoserate schon eine Vielzahl von Zellen aus dem Zellverband abgelöst hatten und in das Medium abgeschwemmt wurden. Nach Exposition mit abgetöteten S4-Jena konnte ebenfalls AnnexinV und Caspasen 3/7 detektiert werden. Dabei war eine verstärkte AnnexinV Färbung sowie eine beginnende Kernfragmentierung nachweisbar (Abbildung 41 C, Pfeil). Nach Exposition mit lebenden S4-Jena waren nur noch wenige T24 Zellen zu finden (Abbildung 41 D). Auch wiesen die Zellen, welche noch adhärten, schon starke Kernfragmentierungen auf (Abbildung 41 D, Pfeil). Ebenfalls konnte AnnexinV Färbung sowie vereinzelt Caspasen 3/7 Aktivierung (Abbildung 41 D) detektiert werden.

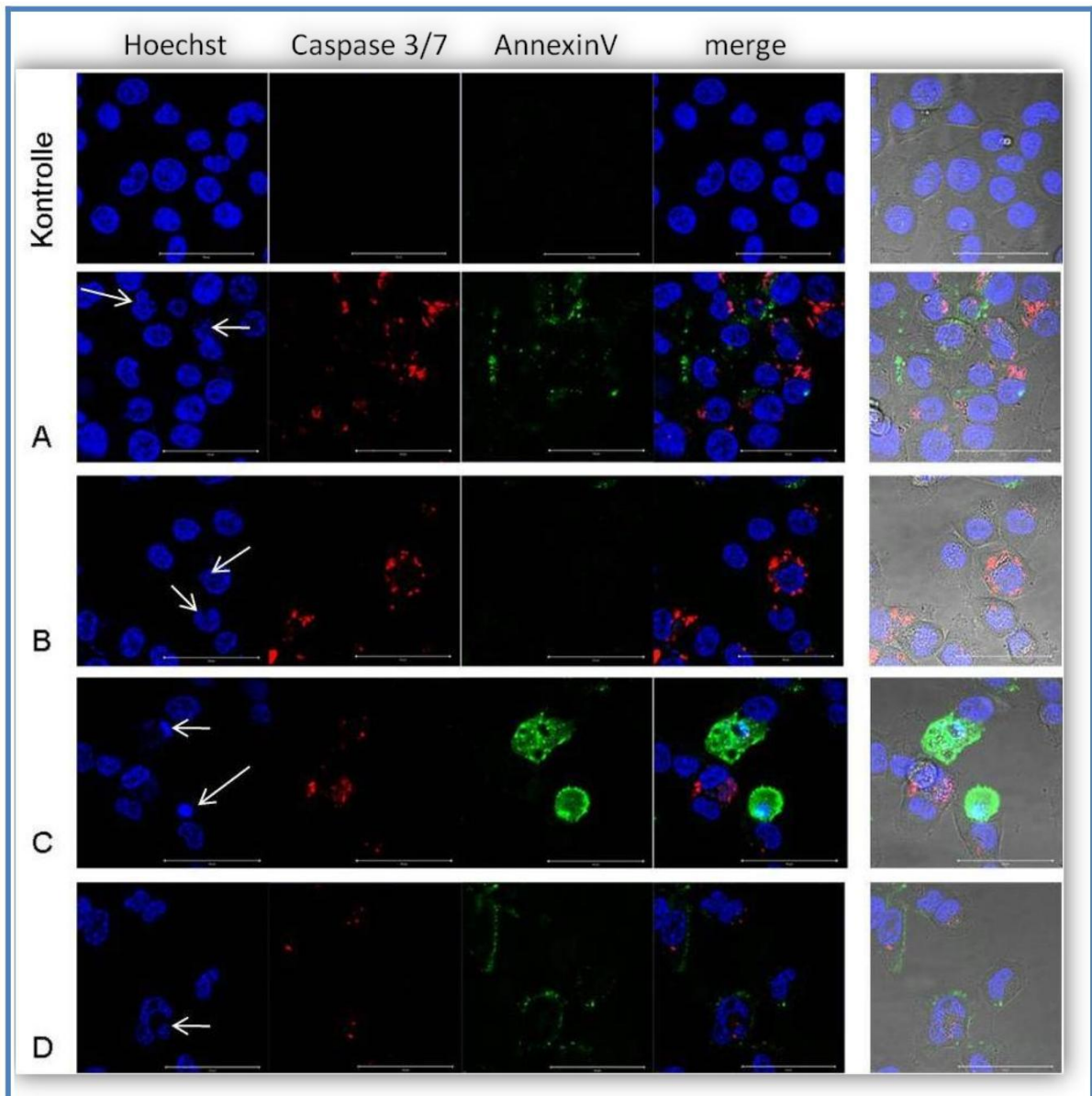


Abbildung 41: Laser Scanning Mikroskopische Aufnahmen der Apoptoseinduktion nach Exposition der T24 Zellen mit S4-Jena und TICE.

LSM Aufnahmen von T24 Zellen 24 h nach Exposition mit S4-Jena und TICE. (Kontrolle: Kontrollzellen, A: abgetötete TICE, B: lebende TICE, C: abgetötete S4-Jena, D: lebende S4-Jena) Messbalken: 20 μm

LSM Untersuchungen der Apoptoserate von Cal29 Zellen nach Exposition mit S4-Jena und TICE

In Cal29 Zellen konnte eine Aktivierung der Caspasen 3/7 lediglich nach Exposition mit lebenden S4-Jena nachgewiesen werden (Abbildung 42 D). Jedoch war der PS-Flip, detektiert durch AnnexinV, nach Exposition mit abgetöteten (Abbildung 42 C) als auch mit lebenden (Abbildung 42 D) S4-Jena nachweisbar. Ebenfalls waren Kernfragmentierungen zu beobachten (Abbildung 42 C-D, Pfeile). Dies zeigte, dass die Exposition mit abgetöteten S4-Jena nach 24 h zu einer beginnenden Apoptose führte. Im Gegensatz dazu zeigte die

Exposition mit TICE weder mit abgetöteten (Abbildung 42 A) noch mit lebenden (Abbildung 42 B) TICE eine Aktivierung der Caspasen 3/7. Allein die Exposition mit abgetöteten TICE führte bei vereinzelt Zellen zum PS-Flip. Betrachtet man die Durchlichtbilder nach Exposition mit abgetöteten und lebenden TICE, so entspricht es dem Bild von Kontrollzellen.

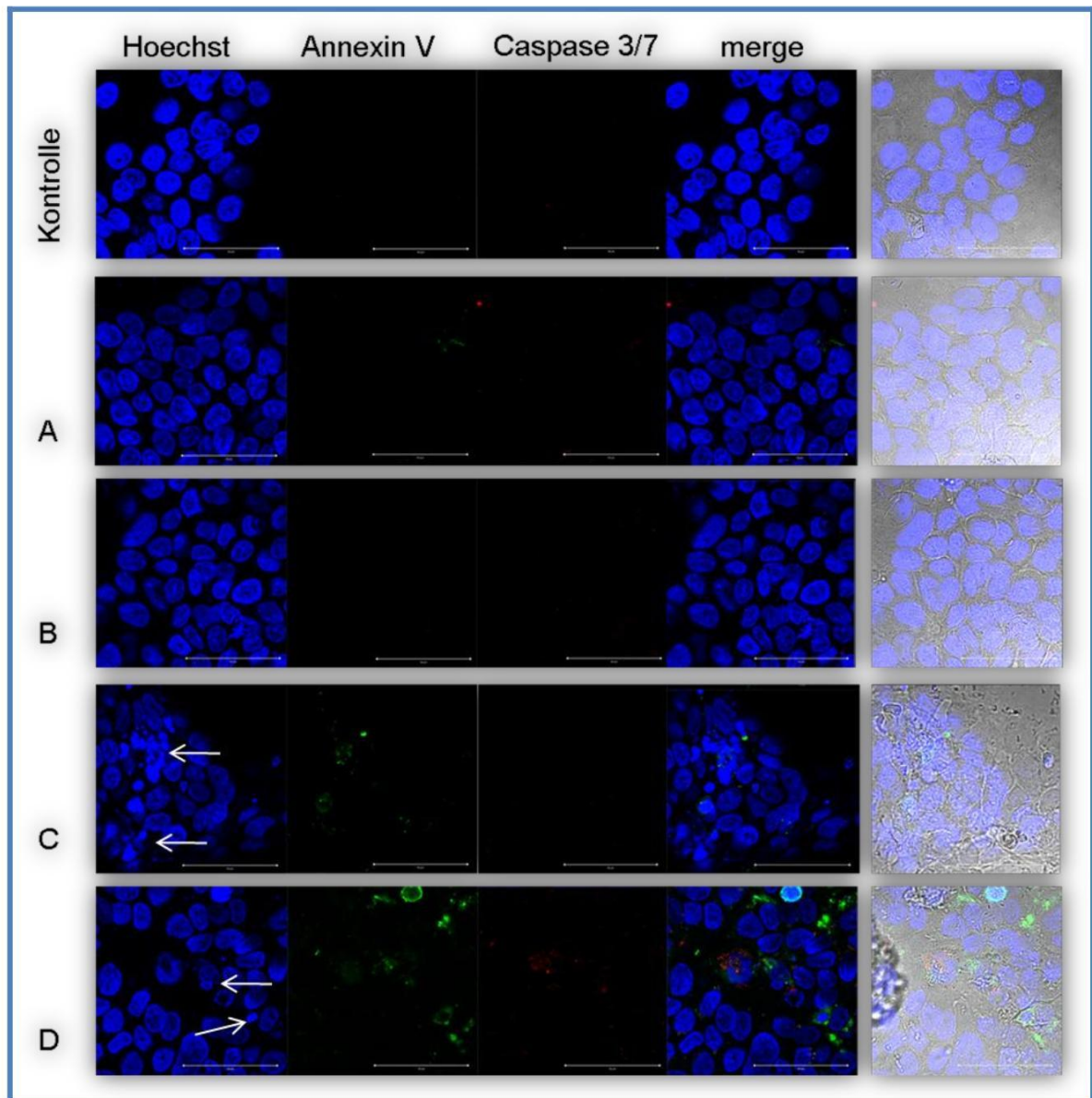


Abbildung 42: Laser Scanning Mikroskopische Aufnahmen der Apoptoseinduktion nach Exposition der Cal29 Zellen mit S4-Jena und TICE.

LSM Aufnahmen von Cal29 Zellen 24 h nach Exposition mit S4-Jena und TICE. (Kontrolle: Kontrollzellen, A: abgetötete TICE, B: lebende TICE, C: abgetötete S4-Jena, D: lebende S4-Jena) Messbalken: 20 μm

Nachweis der Mitochondrienaktivität in exponierten T24 Zellen

Die Exposition mit den beiden BCG Stämmen führte in der T24 Zelllinie zum Zelltod der exponierten Zellen durch Apoptose. Dies konnte im vorangegangenen Kapitel anhand des PS-Flips und einer aktivierten Caspasen 3/7 gezeigt werden. Ein weiteres Merkmal der Apoptose ist der Verlust der Mitochondrienaktivität. In Abbildung 43 ist beispielhaft an T24 Zellen 24 h nach Exposition mit S4-Jena die Mitochondrienaktivität mittels LSM dargestellt. Die lebenden Zellen wurden mit AnnexinV sowie einem Mitochondrienfarbstoff markiert. Der Mitochondrienfarbstoff ist so konzipiert, dass er nur in vitalen Zellen in den Mitochondrien fluoresziert. Im Gegensatz zu vitalen Zellen wiesen die AnnexinV markierten apoptotischen Zellen keine mitochondriale Aktivität mehr auf.

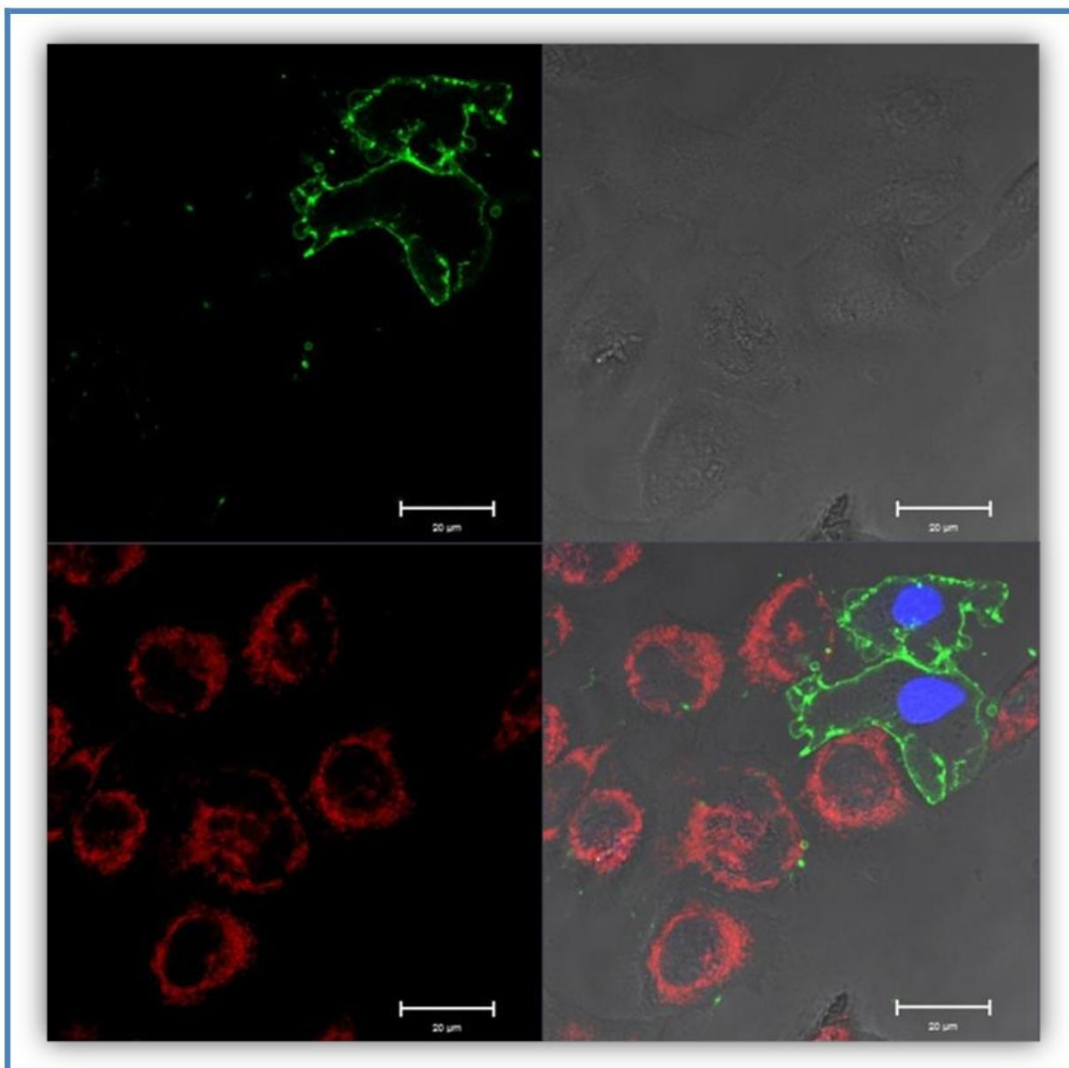


Abbildung 43: Laser Scanning Mikroskopischer Nachweis von Mitochondrienaktivität.

Laser Scanning Mikroskopische Aufnahmen von T24 Zellen 24 h nach Exposition mit lebenden S4-Jena. (rot: Mitochondrien; grün: AnnexinV; blau: Höchst3342) Messbalken: 20 µm

3.7.3 Korrelation zwischen Apoptoseinduktion und Internalisierung der BCG

Um zu überprüfen, ob die apoptotischen Zellen auch beide BCG Stämmen internalisierten, wurden die Zellen mit FITC markierten BCG exponiert und nach einem Expositionszeitraum von 24 h mit Magic Red™-DEVD (Caspasen 3/7) gegengefärbt. In Abbildung 44 A-C konnte dies beispielhaft an lebenden TICE verdeutlicht werden. Diese Aufnahmen zeigen 3D Scans von FITC markierten lebenden TICE nach Magic Red™-DEVD Färbung. Darin konnte nachgewiesen werden, dass Zellen, die BCG internalisierten, in eine Caspasen 3/7 abhängige Apoptose gehen.

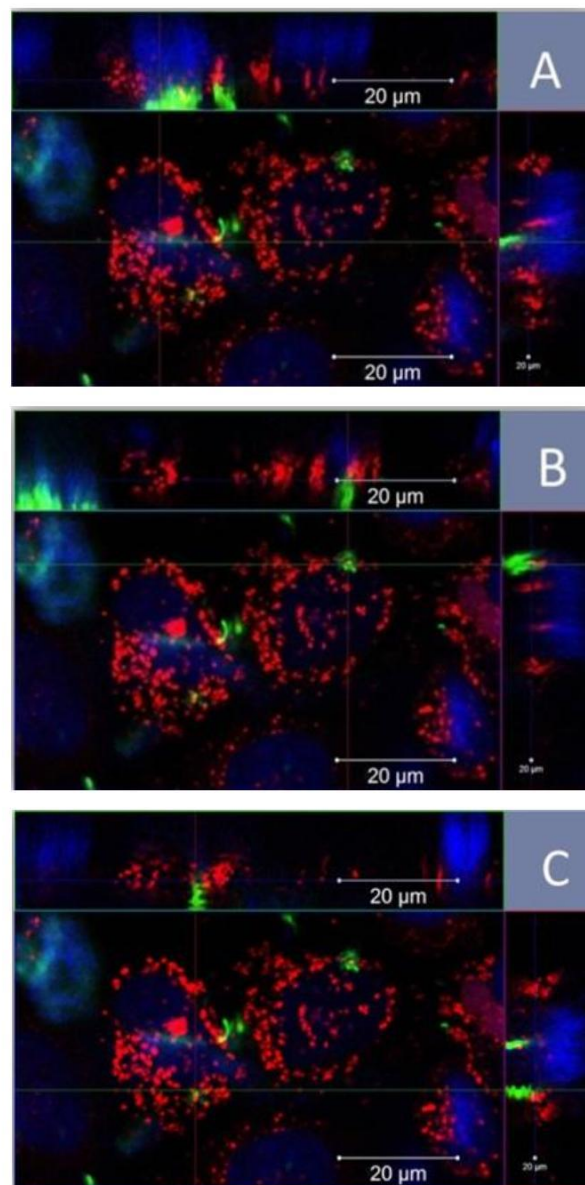


Abbildung 44: Laser Scanning Mikroskopische Aufnahmen der Apoptoseinduktion in Korrelation mit internalisierten BCG.

LSM Aufnahme von T24 Zellen nach 24 h Exposition mit FITC markierten lebenden TICE (grün). Caspasen 3/7 wurde durch Magic Red™-DEVD (rot) detektiert. Die Fadenkreuze zeigen in den 3D Aufnahmen die internalisierten BCG in den betroffenen Zellen. Messbalken: 20 µm

3.7.4 Morphologischer Nachweis der Apoptoseinduktion nach Exposition mit BCG mittels Rasterelektronenmikroskopie

Morphologischer Nachweis der Apoptoseinduktion der T24 Zellen nach Exposition mit S4-Jena und TICE

Um die morphologischen Veränderungen durch eine Apoptose nach Exposition mit beiden BCG Stämmen zu bestätigen, wurden REM Aufnahmen 1 h, 4 h, 12 h und 24 h nach Exposition angefertigt. Die Aufnahmen konnten die Ergebnisse der FACS Analyse bestätigen, bereits 1 h nach Exposition mit abgetöteten sowie lebenden S4-Jena (Abbildung 45) und TICE (Abbildung 46) kam es zu einer Apoptoseinduktion. Dabei war kein Unterschied zwischen abgetöteten und lebenden BCG erkennbar. Im Gegensatz zu S4-Jena führte die Exposition mit TICE zu einem Verkleben der betroffenen Zellen (Abbildung 45). Des Weiteren bildeten sich nach Exposition mit beiden Stämmen Ausstülpungen der Plasmamembran, die sich als sogenannte apoptotische Körperchen (Blebs) abschnürten (Abbildung 45; Pfeile). Diese Ergebnisse unterstützen die Resultate der durchflusszytometrischen Analysen sowie der LSM-Aufnahmen einer Apoptoseinduktion nach Exposition mit den beiden BCG Stämmen. Abschließend konnte gezeigt werden, dass es nach Exposition mit beiden Stämmen bei den T24 Zellen zu einem Abrunden der Zellen und einem Verlust der Adhärenz zu Nachbarzellen kam.

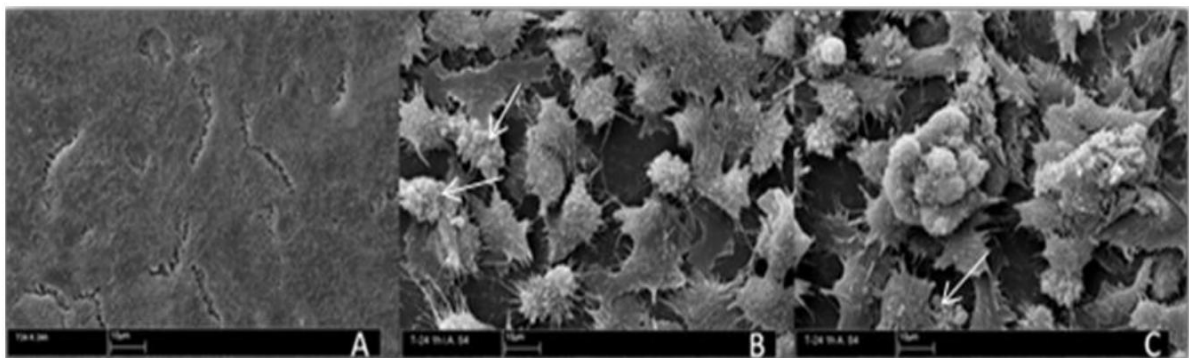


Abbildung 45: Rasterelektronische Aufnahmen der Apoptoseinduktion in T24 Zellen nach Exposition mit S4-Jena.

REM Aufnahmen der Zellmorphologie von T24 Zellen nach Exposition mit S4-Jena. A: Kontrolle, B: abgetötete S4-Jena, C: lebende S4-Jena. Messbalken: 10 µm

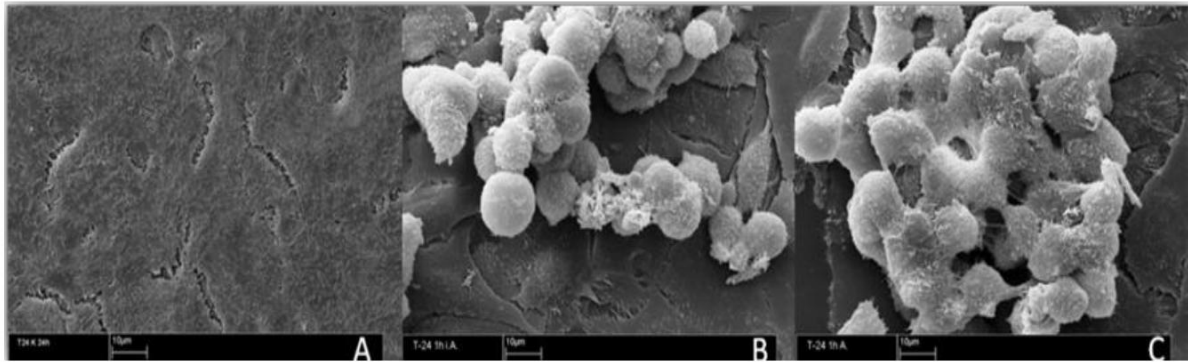


Abbildung 46: Rasterelektronische Aufnahmen der Apoptoseinduktion in T24 Zellen nach Exposition mit TICE.

REM Aufnahmen der Zellmorphologie von T24 Zellen nach Exposition mit TICE. A: Kontrolle, B: abgetötete TICE, C: lebende TICE. Messbalken: 10 µm

Morphologischer Nachweis der Apoptoseinduktion der Cal29 Zellen nach Exposition mit S4-Jena und TICE

Die vorangegangenen Ergebnisse legen nahe, dass nur die Exposition mit dem S4-Jena Stamm zu einem Absterben der Cal29 Zellen führt. Daher wurden mittels REM Aufnahmen die morphologischen Veränderungen nach Exposition mit den beiden Stämmen auf die Cal29 Zellen untersucht. Die Exposition mit abgetöteten S4-Jena führte nach 24 h zu deutlichen, für die Apoptose typischen, morphologischen Veränderungen der Zellen (Abbildung 47 A). Die Zellen lösten sich aus dem Zellverband und rundeten sich ab. Ebenfalls kam es zu sichtbaren Abschnürungen der Plasmamembran, sogenannten Blebs. Die gleichen Ergebnisse konnten auch mit lebenden S4-Jena beobachtet werden (Abbildung 47 C).

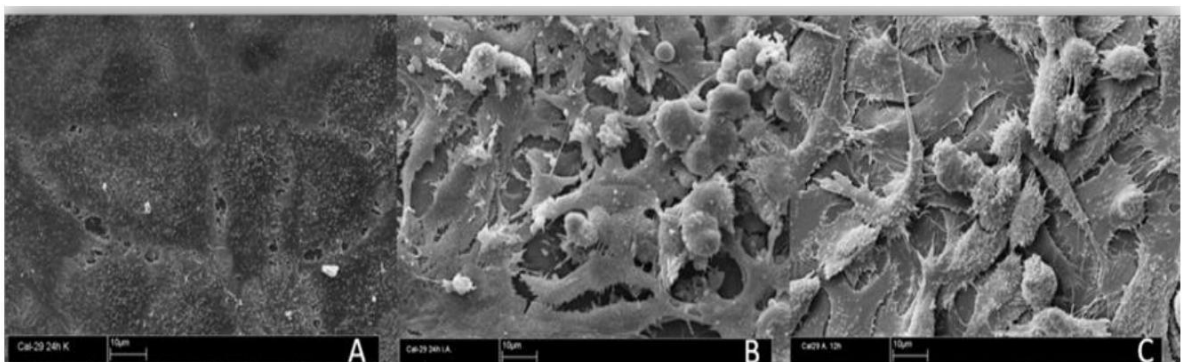


Abbildung 47: Rasterelektronische Aufnahmen der Apoptoseinduktion in Cal29 Zellen nach Exposition mit S4-Jena.

REM Aufnahmen der Zellmorphologie von Cal29 Zellen nach Exposition mit S4-Jena. A: Kontrolle, B: abgetötete S4-Jena, C: lebende S4-Jena. Messbalken: 10 µm

Im Gegensatz dazu führte die Exposition der Cal29 Zellen mit dem TICE Stamm zu keinen deutlich sichtbaren morphologischen Veränderungen (Abbildung 48). Vereinzelt konnten sich abrundende Zellen beobachtet werden. Jedoch entsprach das Gesamtbild dem von nicht exponierten Cal29 Zellen. Ebenfalls konnten die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse zur TICE Adhärenz bestätigt werden (Kapitel 2.4). Die Zellen zeigten adhärente TICE, wobei bei der visuellen Auswertung deutlich mehr lebende als abgetötete TICE adhärent waren.

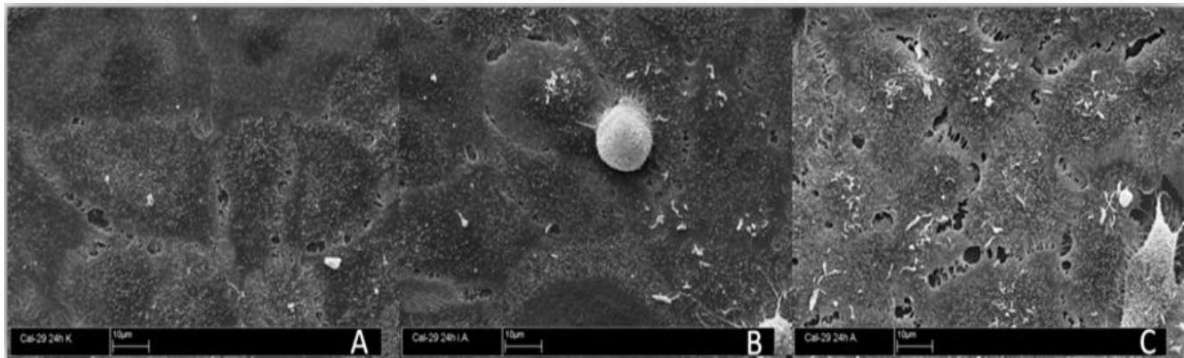


Abbildung 48: Rasterelektronische Aufnahmen der Apoptoseinduktion in Cal29 Zellen nach Exposition mit TICE.

REM Aufnahmen der Zellmorphologie von Cal29 Zellen nach Exposition mit TICE. A: Kontrolle, B: abgetötete TICE, C: lebende TICE. Messbalken: 10 µm

Diese Ergebnisse bestätigen die Resultate der durchflusszytometrischen Analyse und LSM Aufnahmen hinsichtlich der Apoptoseinduktion. Sie zeigten, dass ausschließlich die Exposition mit dem S4-Jena Stamm zum Absterben der Cal29 Zellen führte.

3.8 Nachweis einer Toxinsynthese von S4-Jena und TICE mittels Polyketidanalyse

3.8.1 Messung von Polyketiden in S4-Jena und TICE mittels HSQC NMR

Eine Vielzahl von Bakterien löst in den exponierten Wirtszellen durch die Bildung von Toxinen eine Apoptose aus. Die Arbeitsgruppe um Mahrous et al. konnte in einem HSQC NMR das Toxin Mycolacton A/B eines *Mykobakterium ulcerans* Stammes nachweisen¹¹⁶. In diesem Spektrum ist der Macrolide-Ring (ganzer Kreis) und die Seitenkette (gestrichelter Kreis) von Mycolacton A/B zu erkennen (Abbildung 49 A). Es konnte gezeigt werden, dass die HSQC NMR bei der *M. ulcerans* Mutante MU1615A keine Signale für die Seitenkette aufwies (Abbildung 49 B). Die HSQC NMR wies bei der Mutante

MU1615::Tn104 weder Signale für den Makrolidring noch für die Seitenkette auf (Abbildung 49 C). Beide Mutanten waren nicht zu einer Mycolacton Biosynthese fähig und daher nicht toxisch

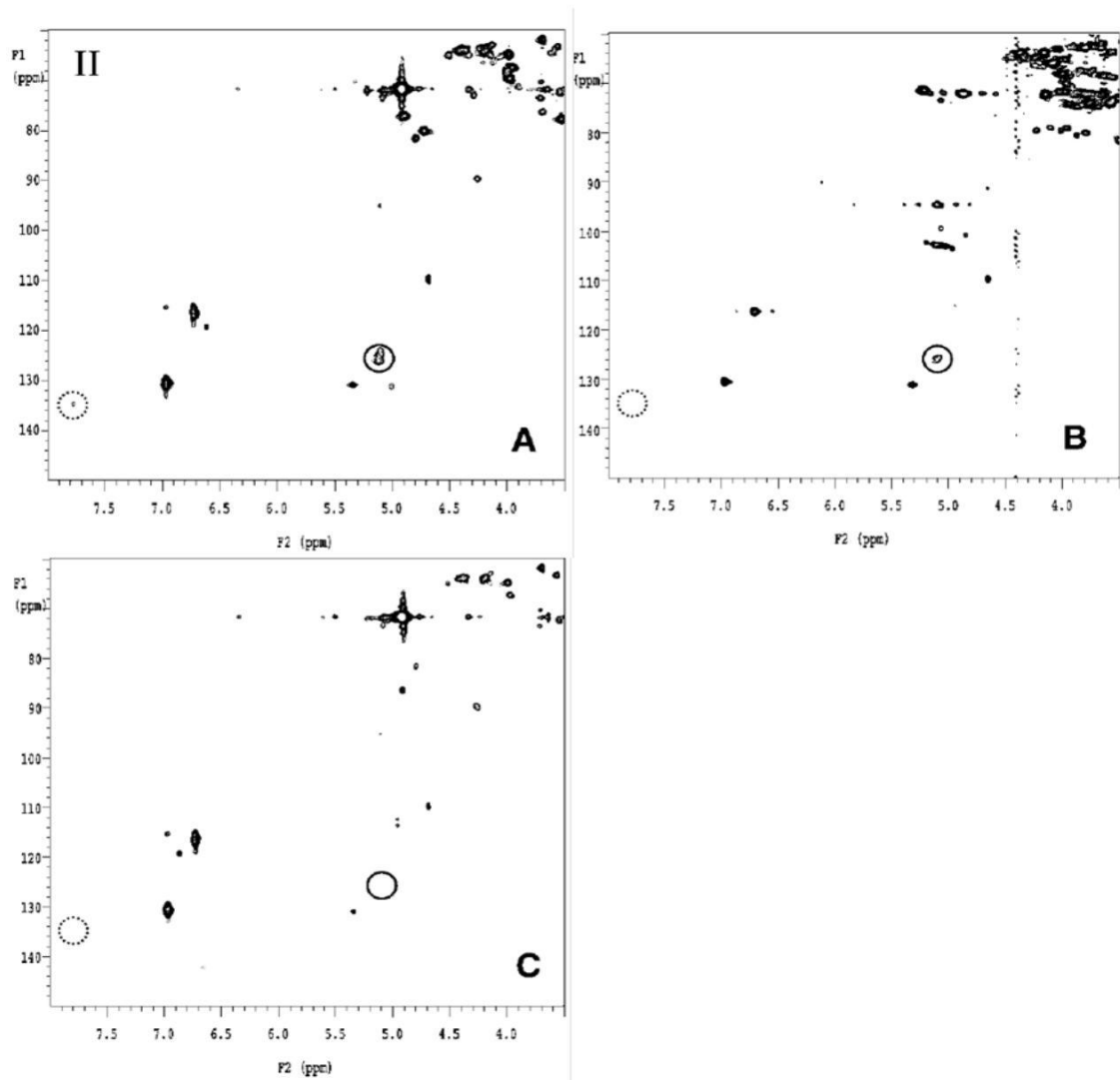


Abbildung 49: HSQC NMR Spektrum von *M. ulcerans* Stämmen aus der Arbeit von Mahrous et al..

Strukturen des Makrolide Toxins Mycolacton A/B. ^1H - ^{13}C HSQC NMR Spektrum der Lipidextraktion von A: *M. ulcerans* 1615, B: *M. ulcerans* 1615A und C: *M. ulcerans* 1615::Tn104. Die Signale des Mycolactonkerns sind mit soliden Ringen und die Signale der Seitenkette sind mit gestrichelte Ringen umkreist¹¹⁶.

Die nahe Verwandtschaft von *M. bovis* zu *M. ulcerans* lässt vermuten, dass die Apoptoseinduktion nach Exposition mit *M. bovis* ssp. BCG auf eine Toxinbildung zurückzuführen ist. Um diese Möglichkeit bei den BCG Stämmen zu überprüfen, wurden mit ^{13}C markierte S4-Jena und TICE Proben mittels einer HSQC NMR Spektrometrie aufgenommen. Hierbei konnte auch bei den beiden BCG Stämmen ein Spektrum des Makrolidringes sowie der Seitenketten von Mycolacton A/B nachgewiesen werden, das dem von *M. ulcerans* entsprach (Abbildung 50). Um eine genaue Strukturanalyse

durchführen zu können, ist eine Isolierung der Reinsubstanz des reinen Mycolactons notwendig. Diese konnte zum jetzigen Zeitpunkt nicht gewonnen werden.

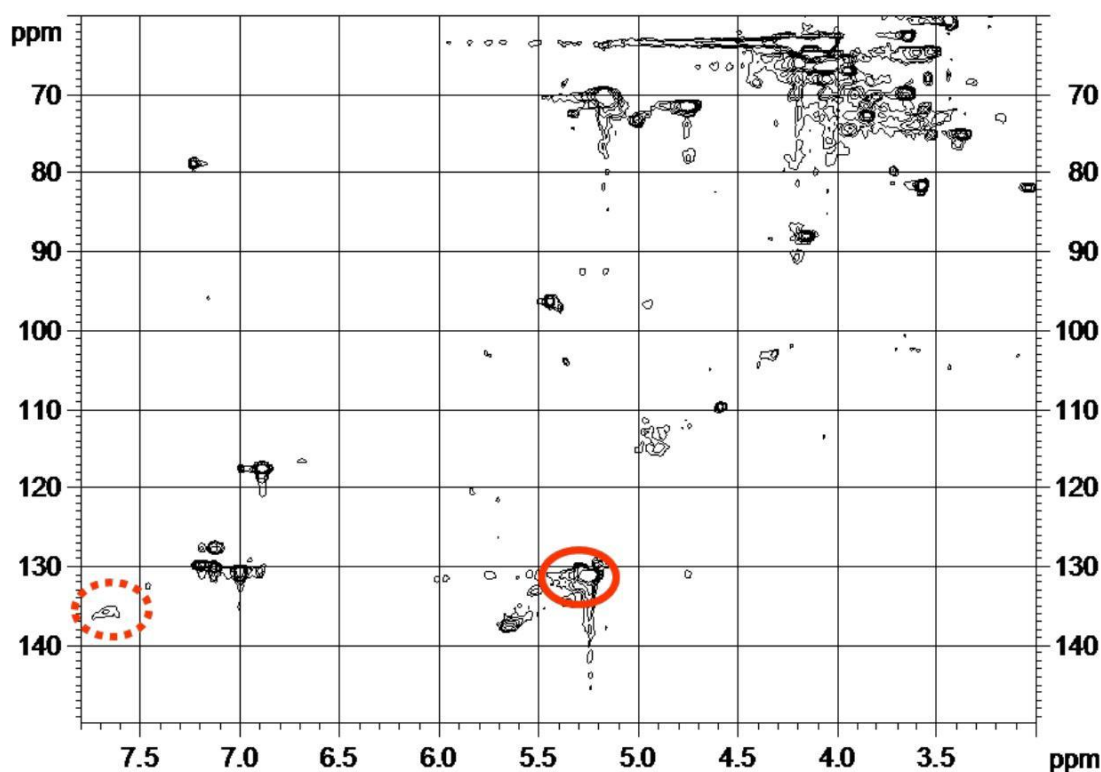


Abbildung 50: HSQC NMR Spektrum einer C13 markierten S4-Jena BCG Probe.

Die Signale des Mycolactonkerns sind mit soliden Ringen und die Signale der Seitenkette mit gestrichelten Ringen umkreist.

3.8.2 Messung der Polyketidkonzentration in den T24 und Cal29 Zellen nach Exposition mit S4-Jena und TICE mittels HPLC-MS

Bei der massenspektrometrischen Analyse ist z.B. bei Mycolacton A/B der Massenspektrometrie (MS)-Peak im Bereich von m/z 765.6 $[M+Na(+)]$ zu finden (Tabelle 5).

Tabelle 5: Massenspektrometrie (MS)-Peak der bekannten Mycolactone.

Dargestellt sind die m/z $[M+Na(+)]$ Peaks der Mycolactone A – G, sowie die entsprechenden Mykobakterien und Wirte^{117,118}.

Mycolacton	m/z	Mykobakterien Stamm	Wirt
A/B	765	<i>M. ulcerans</i> (Afrika)	Mensch
C	749	<i>M. ulcerans</i> (Australien)	Mensch
D	779	<i>M. ulcerans</i> (Asien)	Mensch
E	737	<i>M. liflandii</i>	Frosch
F	723	<i>M. marinum</i> DL045	Fisch
G	739	<i>M. marinum</i>	Fisch

Für die relative Quantifizierung von mycolactonähnlichen Strukturen in den beiden BCG Stämmen wurde die Ionenspur zwischen m/z 760-780 genutzt. Der Hauptpeak der BCG-Probenanalyse war bei m/z 760 zu finden. Dabei wurden die Proben eingeteilt in (-) nicht nachweisbar und (+), (++) , (+++) für die relative Abstufung der Konzentration.

Um zu untersuchen, wie sich die „Mycolactonkonzentration“ der beiden BCG Stämme nach Exposition in den Zelllinien T24 und Cal29 verändert, wurden die Zellen zeitabhängig mit lebenden BCG exponiert (Tabelle 6). In den Kontrollzellen von T24 und Cal29, die nicht mit BCG exponiert waren, konnte kein Mycolacton nachgewiesen werden.

Bei den T24 Zellen konnte bereits 4 h nach Exposition mit S4-Jena eine geringe Konzentration von Mycolacton nachgewiesen werden. Diese Konzentration blieb in einem Zeitraum von 24 h unverändert. Die Exposition der T24 Zellen mit TICE führte erst nach 12 h zu einem Nachweis von Mycolacton und blieb bis 24 h konstant.

Bei den Cal29 Zellen wurde bereits 1 h nach Exposition mit dem TICE Stamm Mycolacton nachgewiesen, dessen Konzentration sich über den gesamten gemessenen Zeitraum nicht änderte. Dagegen konnte in den S4-Jena exponierten Cal29 Zellen erst nach 4 h Mycolacton nachgewiesen werden. Die Mycolactonkonzentrationen war hier jedoch doppelt so hoch wie nach der Exposition mit dem TICE Stamm. Nach 24 h sank die Mycolactonkonzentration wieder ab, da sich zu diesem Zeitpunkt wahrscheinlich schon vermehrt Cal29 Zellen nach Exposition mit S4-Jena abgelöst hatten. Diese wurden daher nicht in die Untersuchung mit einbezogen.

Tabelle 6: HPLC-MS Spektrometrie zur Bestimmung der Mycolactonkonzentration in T24 und Cal29 Zellen nach Exposition mit lebenden BCG.

Massenspektrometrische Analyse der relativen Mycolactonkonzentration im Bereich m/z 760 der T24 und Cal29 Zellen nach Exposition mit lebenden S4-Jena BCG und TICE BCG für 1 h, 4 h, 12 h und 24 h. ((-) nicht nachweisbar und (+), (++) , (+++))

relative Mycolactonkonzentration	T24	Cal29
Kontrolle	-	-
1 h S4-Jena	-	-
1 h TICE	-	+
4 h S4-Jena	+	++
4 h TICE	-	+
12 h S4-Jena	+	++
12 h TICE	+	+
24 h S4-Jena	+	+
24 h TICE	+	+

3.8.3 Messung der Polyketidkonzentration von S4-Jena und TICE nach Inkubation in Probandenurin mittels HPLC-MS

Für die HPLC-MS wurden 100 µl (1×10^6 CFU/ml) von abgetöteten sowie lebenden S4-Jena und TICE für 24 h in DMEM-Medium (Kontroll-BCG) sowie in dem Urin von zwei Probanden bei 37°C inkubiert. Der Urin des Probanden 1 hatte einen pH-Wert von pH 4,6 und der Urin des Probanden 2 einen pH Wert von 6,5.

Die Mycolactonkonzentration von abgetöteten S4-Jena sank nach Inkubation im Urin der Probanden 1 und 2 im Vergleich zu im Zellmedium DMEM inkubierten S4-Jena (Tabelle 7). Dagegen verdreifachte sich die Mycolactonkonzentration von lebenden S4-Jena nach 24 h Inkubation im Urin des Probanden 1, blieb jedoch im Urin des Probanden 2 auf Kontrollniveau.

Bei abgetöteten TICE war nach Inkubation im Urin beider Probanden eine geringe Mycolactonkonzentration nachweisbar, wohingegen bei abgetöteten TICE, welche nur in Zellmedium DMEM inkubiert wurden, kein Mycolacton nachgewiesen werden konnte. Die HPLC-MS zeigte, dass die Mycolactonkonzentration bei lebenden TICE, die im Urin des Probanden 1 inkubiert wurden, im Vergleich zu dem Kontrollmedium-BCG gleich blieb. Nach der Inkubation im Urin des Probanden 2 sank jedoch die Mycolactonkonzentration.

Tabelle 7 HPLC-MS Spektrometrie zur Bestimmung der Mycolactonkonzentration von S4-Jena und TICE nach Inkubation in Probandenurin.

Massenspektrometrische Analyse der relativen Mycolactonkonzentration im Bereich m/z 760 der im Medium inkubierten BCG Stämme S4-Jena und TICE sowie nach Inkubation in Probandenurin. ((-) nicht nachweisbar und (+), (++) , (+++))

relative	Kontrolle	Proband 1	Proband 2
abgetötete S4-Jena	++	+	+
abgetötete TICE	-	+	+
lebende S4-Jena	+	+++	+
lebende TICE	++	++	+

Anschließend wurde überprüft, ob die erhöhte Mycolactonkonzentration nach Inkubation der BCG in den Probandenurinen eine Auswirkung auf die Proliferation der T24 und Cal29 Zellen hat. Dafür wurden die Zellen mit den BCG Überständen versetzt, welche 24 h im Medium sowie in den Probandenurinen inkubiert wurden, und Proliferationstests durchgeführt. Es zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu Zellen die in nicht konditioniertem Medium inkubiert wurden (Daten nicht gezeigt).

4 Diskussion

Für die Therapie des nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms ist nach EAU Guideline die BCG Therapie der Goldstandard bei „high grade“ Karzinomen ⁵⁶. Der Wirkmechanismus der BCG Therapie auf die Harnblasenkarzinomzellen ist bis heute nicht ausreichend geklärt. Eine Vielzahl von Autoren geht immer noch von einer alleinigen indirekten Immunstimulierung nach Instillation der BCG Bakterien aus. Dem stehen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit entgegen. Im Folgenden soll nun der Mechanismus der direkten BCG-Karzinomzell-Interaktion näher charakterisiert werden. Des Weiteren soll das Potenzial des S4-Jena BCG Stammes im Vergleich mit einem kommerziell erhältlichen BCG Stamm für die Therapie des NMIBC diskutiert werden. Hierzu dienen die Ergebnisse der Untersuchungen an den humanen Harnblasenkarzinomzelllinien T24 und Cal29.

4.1 Charakterisierung des S4-Jena Stammes im Vergleich mit den kommerziell erhältlichen BCG Stämmen

Ein erstes Ziel der Studie war es, den S4-Jena Stamm mit den für die NMIBC Therapie in Deutschland erhältlichen Stämmen genetisch zu vergleichen. Mittels PFGE wurden zunächst die Unterschiede zwischen den einzelnen BCG Stämmen analysiert. Hinsichtlich der DNA Polymorphismen wurden eindeutige Differenzen zwischen dem S4-Jena Stamm und den anderen getesteten BCG Stämmen (RIVM, TICE und Connaught) nachgewiesen. Die Veränderungen bezogen sich auf drei Banden der PFGE. Der S4-Jena Stamm zeigte im Vergleich zu den kommerziell erhältlichen Stämmen einen Verlust von zwei Banden (203 kbp und 134 kbp). Jedoch wies er eine größere Bande im Bereich von 267 kbp auf, welche den anderen Stämmen fehlte. Dies ist jedoch kein Indiz dafür, dass der S4-Jena Stamm nicht mehr zum Stammbaum der BCG Familie gehört. Erst ab einem Unterschied von fünf Banden wäre ein genetischer Zusammenhang unwahrscheinlich ¹¹⁹. Auch zeigte die Spoligotypisierung des Nationalen Referenzlabors für Mykobakterien in Borstel eine eindeutige Zuordnung des BCG S4-Jena Stammes zur BCG-Familie. Die Ergebnisse der PFGE stimmen mit den Schlussfolgerungen einer BCG-Studie überein, welche die Stämme RIVM, TICE und Connaught in eine späte BCG Tochtergruppe, [DU2 groupIV; Δ int], einordnet ⁹³. Die [DU2 groupIV; Δ int] Gruppe zeichnet sich durch eine hohe Deletionsrate aus. S4-Jena BCG ist ein direkter Abkömmling des Schweden Stammes (Abbildung 51).

Basierend auf dieser Tatsache kann der S4-Jena Stamm in eine frühe Gruppe der BCG Tochterstämme, [DU2 groupII; Δint], eingeordnet werden. Diese Gruppe zeigt eine geringe Anzahl von Deletionen.

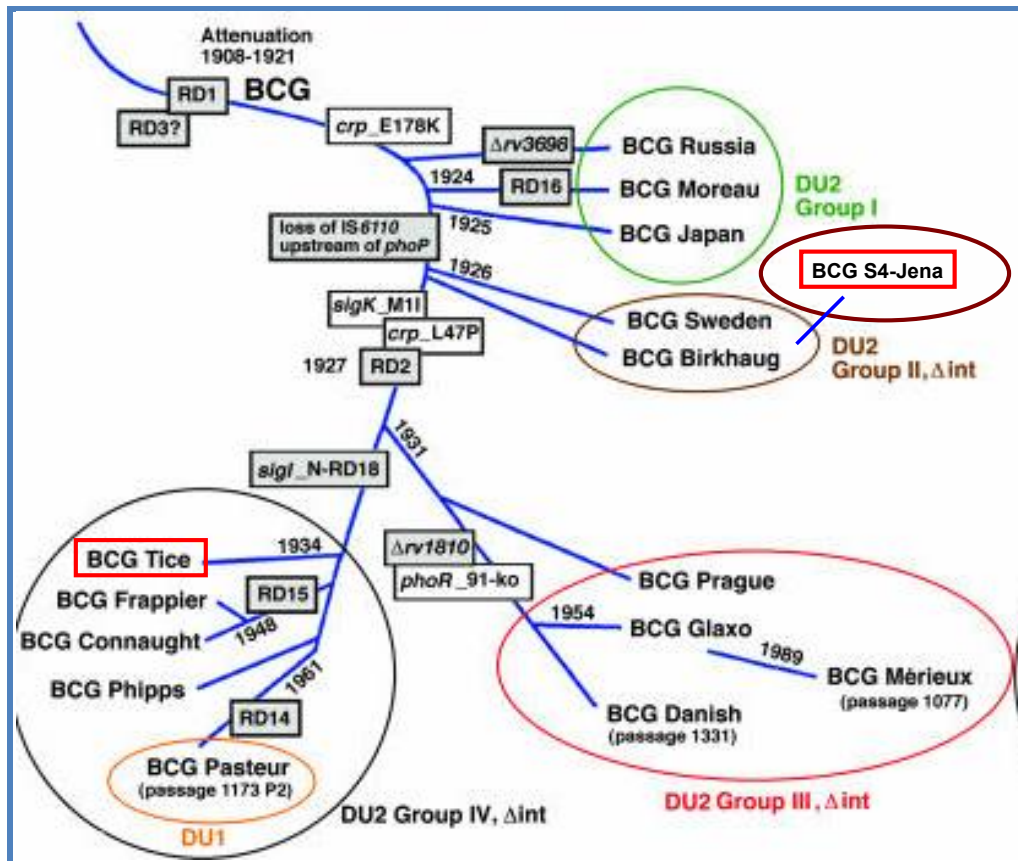


Abbildung 51: BCG Stammbaum.

Das modifizierte Schema, aus der Arbeit von Brosch *et al.*, zeigt die Positionen der identifizierten genetischen Marker.

4.2 Funktionelle Charakterisierung des S4-Jena Stammes in Bezug auf sein therapeutisches Potential

Ein weiteres Ziel dieser Studie war die funktionelle Charakterisierung des S4-Jena Stammes als potentielles Therapeutikum für die Instillationstherapie des NMIBC. Dafür wurden in der vorliegenden Arbeit der [DU2 groupII; Δint] Stamm S4-Jena mit dem kommerziell erhältlichen [DU2 groupIV; Δint] Stamm TICE der Firma Apogeapha verglichen. Denn trotz etablierter BCG-Therapie des NMIBC seit 1976 durch Morales *et al.* ist der genaue Wirkmechanismus nur unzureichend geklärt⁸⁵. BCG wird als lebendes Bakterium in die Harnblase ca. vier Wochen nach TUR instilliert. Dies bewirkt lokale und systemische Effekte. Die lokalen Effekte von BCG beinhalten in ca. 90 % der Fälle irritative Entleerungssymptome wie plötzlicher Harndrang und erhöhte Harnfrequenz^{120,121}. Noch

häufiger sind systemische Symptome wie Fieber und Unwohlsein. Die Therapie kann jedoch auch zu einer Tuberkulose der ableitenden Harnwege führen¹²²⁻¹²⁴ oder im schwersten Fall zu einer BCGitis, die eine Miliartuberkulose durch BCG darstellt^{125,126}.

Hinsichtlich der Mechanismen der BCG Therapie wurden bisher viele Theorien vorgeschlagen. Eine Theorie ist die „nicht so harmlose“ Bystander Theorie der BCG Behandlung. Dabei resultiert die BCG Therapie in einer diffusen inflammatorischen Zerstörung aller urothelialen Zellen und zufällig werden maligne Zellen mit zerstört¹²⁷. Weiterhin wird diskutiert, dass die Adhärenz von BCG vorwiegend an Stellen stattfindet, an denen extrazelluläre Matrix exponiert ist, wie z.B. Resektions- bzw. Koagulationsareale^{128,129}. Bis jetzt hat jedoch keine Theorie erklären können, wie BCG maligne Zellen direkt therapeutisch beeinflusst.

Die Transkriptionsanalyse mit der Mikroarraytechnologie ermöglicht es, einen Einblick in die Zellfunktionen nach äußeren oder inneren Stimulierungen zu bekommen. Dafür wurden in dieser Arbeit die Genexpressionsprofile von Harnblasenkarzinomzellen nach Exposition mit S4-Jena und TICE BCG untersucht und deren zeitlicher Verlauf charakterisiert. Unter den veränderten Genen befanden sich unter anderem solche Gene, die direkt aber auch indirekt mit Proliferation, Zellzyklus oder Apoptose in Verbindung stehen. Bei der Interpretation der Ergebnisse ist der Zusammenhang der Gensignaturen zu den biologischen Prozessen zu berücksichtigen. Nur auf Grund der Mikroarraydaten ist jedoch keine Aussage der Effekte von BCG auf die Harnblasenkarzinomzellen möglich. So können kleine Veränderungen starker Gensignale zu dramatischen Auswirkungen führen. Dagegen können große Unterschiede in der Expression schwacher Gensignale neutral bleiben. Es stellte sich dadurch die Frage, welche Veränderungen in der Genexpression sich auf die biologischen Prozesse auswirkten. Die dadurch gewonnenen Erkenntnisse liefern einen Beitrag zum Verständnis der molekularen Mechanismen der BCG-Therapie. Für die Genexpressionsanalysen wurde der Mikroarray Lab-Arraytor® human 60-inflammation der Firma SIRSLab verwendet. Dieser beinhaltet 780 Gene, unter anderem für verschiedene Zellfunktionen wie Apoptose, Proliferation und Zellzyklus. Im nachfolgenden werden die Genexpressionsänderungen nach Exposition mit den BCG Stämmen, basierend auf den Funktionen ihrer Proteinprodukte, diskutiert. Für die Auswertung der Expressionsdaten wurde die Ingenuity Software verwendet. Diese Software erstellt anhand der Genexpressionsdaten Signalwege für verschiedene

Zellfunktionen oder Netzwerke. Ebenfalls können Genexpressionsprofile in Signalwegen, die in bestimmten Erkrankungen, wie z.B. dem Harnblasenkarzinom, gestört oder beeinflusst sind, untersucht werden. Parallel dazu werden weitere Methoden zur Unterstützung der Genexpressionsdaten erläutert. Dabei wird zunächst nur auf die Gene eingegangen, welche im Zusammenhang mit Adhärenz und Internalisierung, Proliferation, Zellzyklus und Apoptose stehen. Weiterhin werden die in der Literatur des NMIBC diskutierten Gene in die Untersuchung mit einbezogen. Diese Arbeit ist zum jetzigen Zeitpunkt die erste auf Mikroarray basierende Genexpressionsanalyse von Harnblasenkarzinomzelllinien nach Exposition mit BCG.

4.2.1 Adhärenz und Internalisierung

Bakterielle Expositionen sind meistens über die Adhäsion des Pathogens an die Wirtszellen über Oberflächen-assoziierte Zellproteine initiiert^{130,131}. BCG binden durch das 50 kDa große Protein FAP (Fibronectin attachment protein) über Fibronektin, ein 440 kDa großes extrazelluläres Matrixglycoprotein, an die Harnblasenkarzinomzellen^{129,132-135}. Durch die Zugabe von freiem FAP kann die BCG Adhäsion an Harnblasenkarzinomzellen *in vivo* und an die Harnblasenwand *in vitro* effektiv geblockt werden^{129,136}. Die Adhärenz von BCG findet vor allem an Stellen statt, an denen extrazelluläre Matrixproteine exponiert sind, wie z.B. Resektions- bzw. Koagulationsareale^{128,129}. BCG besitzt im Vergleich zu Karzinomzellen eine geringe Adhärenz zu normalen Urothelzellen¹³⁷. Auch zu Fibroblasten, glatten Muskelzellen und Endothelzellen weisen BCG eine geringe Affinität auf¹³⁸. Andere Mykobakterien, wie z.B. *M. leprae*, können ebenfalls über FAP an Epithelzellen oder Schwannsche Zellen binden¹³⁹. Die Bindung über Fibronektin an die Wirtszelle ist auch bei anderen Bakterien wie z.B. *Staphylococcus aureus* und *Streptokokken* bekannt^{140,141}. Wahrscheinlich ist die Fibronektin-vermittelte Bindung von Bakterien an ihre Wirtszellen wichtig für eine beginnende Exposition wie z.B. Endokarditis, Phlebitis und Fremdkörperinfektionen^{142,143}.

Der erste Schritt nach der intravesikalen BCG Instillation ist die Adhäsion und Internalisierung der BCG an die urothelialen Karzinomzellen^{129,134,135}. Die Bindung von BCG an Fibronektin der Wirtszellen kann durch die Vorbehandlung der BCG mit löslichem Fibronektin inhibiert werden¹³⁶. Ein erhöhter Fibronektinwert im Urin der Patienten wurde im Zusammenhang mit einem Fehlschlagen der BCG Therapie beobachtet¹⁴⁴. Außerdem kann die Internalisierung der BCG durch Zugabe von Cytochalasin B, welches

die Polymerisierung des Aktins stört, verhindert werden^{145,146}. Nach Exposition der Zelllinien T24 und MBT-2 (Maus Harnblasenkarzinomzelllinie) mit dem BCG Stamm Frappier wurde ein Maximum an internalisierten BCG nach 3 h erreicht. Dabei variierten die Internalisierungsraten zwischen 50 - 70 %¹⁴⁵. MBT-2 Zellen, exponiert mit dem Tokyo 172 Stamm, erreichten jedoch erst nach 48 h (mit 78 %) bei „nicht lyophilisierten BCG und nach 72 h (mit 50 %) bei lyophilisierten BCG ein Maximum in der Internalisierungsrate¹⁴⁷. Durch Autoklavierung abgetötete BCG wiesen nach 24 h mit 18,2 % eine maximale Zellexposition auf. In beiden Studien wurden die Daten ausschließlich anhand von mikroskopischen Auswertungen erhoben.

In der vorliegenden Studie konnte mittels durchflusszytometrischen Analysen bereits nach einer Stunde eine Adhärenz der beiden BCG Stämme S4-Jena und TICE an die T24 Zellen verzeichnet werden. Die Adhärenz- und Internalisierungsraten stiegen über einen Zeitraum von 24 h stetig an. Nach 24 h Stunden waren über 90 % der T24 Zellen mit den beiden BCG Stämmen beladen. Durchflusszytometrische Analysen der Exposition von T24 Zellen mit lebenden BCG des Stammes Connaught zeigten, dass bereits nach 4 h ca. 68 % beladen waren¹⁴⁸. Jedoch konnte diese Studie nicht zwischen Adhärenz und Internalisierung unterscheiden. In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass auch abgetötete S4-Jena und TICE BCG an die T24 Zellen binden und internalisieren. Dabei lag nur ein geringer Unterschied zu lebenden BCG vor. Dies bestätigt Ergebnisse, wonach es auch nach Exposition mit lebenden sowie abgetöteten Connaught BCG zu einer Internalisierung kam¹³⁸. Aufgrund dieser Ergebnisse lässt sich schlussfolgern, dass auch abgetötete BCG zur Therapie verwendet werden können, wodurch Nebenwirkungen durch BCG Exposition vermeidbar wären.

In Bezug auf die Adhärenz- und Internalisierungsraten unterschieden sich die Cal29 Zellen deutlich von den T24 Zellen. In Cal29 Zellen zeigte der S4-Jena Stamm eine geringere Internalisierungsrate im Vergleich zu T24 Zellen bei gleichbleibender Adhärenz. Nach Exposition mit dem TICE Stamm konnte bei den abgetöteten BCG zwar eine Adhärenz an die Cal29 Zellen nachgewiesen werden, jedoch war die Internalisierung fast vollständig gehemmt. Dies lässt die Vermutung zu, dass das Abtöten der TICE BCG durch Hitze einen wichtigen Proteinkomplex zerstört. Dieser scheint für die Internalisierung in die Cal29 Zellen in hoher Konzentration benötigt zu werden. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass Cal29 Zellen nur eine geringe Rezeptordichte für diesen Proteinkomplex aufweisen. Die Unterschiede zu den T24 Zellen könnten darauf beruhen, dass entweder dieser

Proteinkomplex für die Internalisierung in die T24 nicht benötigt wird oder das T24 Zellen eine höhere Rezeptordichte aufweisen.

In bisherigen Studien zur Internalisierung von BCG in Karzinomzellen konnten lediglich adhärente BCG sowie schon internalisierte BCG nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig anhand von REM Aufnahmen gezeigt, wie die BCG von den Zellen nach erfolgter Adhärenz endozytiert und damit internalisiert werden (Abbildung 21). Da dies sowohl bei lebenden als auch bei abgetöteten BCG der Fall war, ist damit der Beweis einer aktiven, von der Karzinomzelle ausgehenden Internalisierung erbracht.

4.2.2 Proliferation

Einige Studien an Harnblasenkarzinomzelllinien haben gezeigt, dass die Exposition mit BCG zu einer Proliferationsinhibierung führt ¹⁴⁹. Diese ist von der BCG Konzentration abhängig ^{149,150}. In einer vergleichenden BCG Studie wurde die Überlegenheit des RIVM Stammes gegenüber den Connaught und TICE Stämmen deutlich ¹⁵⁰. Ebenfalls führt die Kombination von BCG und IFN- α -2b zu einer signifikant stärkeren Proliferationsinhibierung der exponierten Zellen ¹⁵¹. Auch wirkt sich die Internalisierungsrate der BCG deutlich auf die Proliferationsinhibierung der Zellen aus ¹⁵². In der vorliegenden Studie war die Proliferationsrate in den T24 Zellen nach Exposition sowohl mit dem S4-Jena als auch mit dem TICE Stamm deutlich gesunken. Diese Ergebnisse bestätigen die Aussagen, dass die Exposition mit dem TICE Stamm zu einer Proliferationsinhibierung in T24 Zellen, wie auch in 253J Zellen, führt ¹⁵³. Im Gegensatz zu Zhang et al. ¹⁵² konnte aber in der vorliegenden Studie der Nachweis erbracht werden, dass auch abgetötete BCG zu einer Proliferationsinhibierung führen. Nach Exposition mit dem Tokyo 172 Stamm kam es in der T24 Zelllinie nur mit lebenden BCG nicht mit abgetöteten BCG zu einer Proliferationsinhibierung über 120 h ¹⁵⁴. Zelllinien, welche nicht in der Lage waren BCG zu internalisieren, wiesen auch keine zytotoxischen Effekte auf ¹⁵⁵. Dies stimmt mit den Ergebnissen überein, dass Cal29 Zellen kaum TICE BCG internalisierten und entsprechend keine Proliferationsinhibierung aufwiesen. Zusammenfassend ist festzustellen, dass mit steigender Internalisierungsrate der BCG die Proliferation der Harnblasenkarzinomzelllinien T24 und Cal29 stärker inhibiert wird.

4.2.3 Zellzyklushemmung/ Apoptose

Die Proliferationsinhibierung von Harnblasenkarzinomzellen nach Exposition mit BCG kann auf einen Zellzyklusarrest zurückgeführt werden ¹⁵³. Die einzelnen Phasen des Zellzyklus sind essentiell für ein gesundes Gleichgewicht der Zellen. In Karzinomzellen liegt ein Ungleichgewicht zwischen Proliferation und Apoptose in Richtung Proliferation vor. Es kann zu einem Zellzyklusarrest in der G1-Phase kommen, wenn z.B. Noxen die Zellen schädigen. Ist die Zelle irreversibel gestört, kommt es zum programmierten Zelltod (Apoptose). Zur Abwehr einer bakteriellen Exposition stehen dem Organismus verschiedene Mechanismen zur Verfügung. Dazu zählen unter anderem die zelluläre und humorale Immunantwort. Ebenfalls kann es zu einer Induktion der Apoptose der betroffenen Zellen kommen, um eine weitere Verbreitung der Bakterien im Organismus zu verhindern.

Nach Exposition der T24 Zellen durch S4-Jena oder TICE war kein Arrest in der G1-Phase nachweisbar, da die exponierten Zellen durch Apoptose bereits abgetötet waren. Dies wurde durch den Anstieg der Zellen in der SubG1-Phase nachgewiesen. Die Progression aus der G1-Phase in die S-Phase ist durch spezifische Veränderungen im Genexpressionsprofil gekennzeichnet. Die Exposition der Cal29 Zellen mit TICE BCG führte zu keinem Zellzyklusarrest. Das kann auf einem Anstieg der Genexpression von Zyklin D1 und D3 beruhen. Parallel dazu kam es zu einem Anstieg der Cdk4 Expression. Dagegen führte die Exposition der T24 Zellen mit S4-Jena oder TICE und der Cal29 Zellen mit S4-Jena zu keiner relevanten Genexpressionsveränderung von Zyklin D1 und D3. Nachfolgend sank die Genexpression von Cdk4 in den T24 Zellen nach Exposition mit S4-Jena und TICE. Die Exposition der Cal29 Zellen mit S4-Jena zeigte keine Veränderung der Cdk4 Expression. Jedoch kam es zu einem Anstieg der Genexpression des Cdk-Inhibitors P21Kip1 nach Exposition der Cal29 Zellen mit TICE. Dies scheint jedoch keine Auswirkungen auf den Zellzyklusarrest zu haben. Dass die Exposition mit dem TICE Stamm auch in T24 sowie in 253J Zellen zu einer Überexpression von P21Kip1 führt ¹⁵⁶, konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Eine Überexpression von P21Kip1 führt zu einem G1- und S-Phase Arrest der Zellen ^{157,158}. Es kann aber auch den Zyklin/Cdk4/Cdk6-Komplex stabilisieren und somit die Proliferation aktivieren ¹⁵⁹. Eine Vielzahl von Studien hat darauf hingewiesen, dass P21Kip1 auch als Apoptoseinhibitor fungieren kann ^{160,161}. Die Exposition von T24 und 253J Zellen mit TICE führte nach 24 h zu einem Arrest in der G1-Phase. Gleichzeitig kam es zu einer Abnahme der S-Phase und G2/M-Phase. In

Bronchialepithelzellen führte die Exposition mit BCG zu einem Anstieg der G1-Phase mit gleichzeitiger Hemmung der S-Phase über einen Zeitraum von 72 h ¹⁶². In den Maus Urothelkarzinomzellen MB49 konnte ebenfalls ein Anstieg der G1-Phase mit einer gleichzeitigen Abnahme der G2/M-Phase nach Exposition mit TICE gemessen werden ¹⁶³. Keine dieser Studien ging jedoch auf die SubG1-Phase ein. In der Untersuchung der T24 Zellen nach Exposition mit S4-Jena und TICE konnten diese Ergebnisse nur teilweise bestätigt werden. Weder nach Exposition mit lebenden noch mit toten BCG konnte ein Zellzyklusarrest in der G1-Phase gemessen werden. Die Anzahl der Zellen in der G1-Phase sowie G2/M-Phase verringerte sich. Dafür gab es einen Anstieg der Zellen in der SubG1-Phase. Dies ist ein eindeutiges Zeichen für apoptotische Zellen. Bei der Cal29 Zelllinie konnte lediglich nach Exposition mit S4-Jena ein Anstieg der Zellen in der SubG1-Phase verzeichnet werden. Zusätzlich wurde ein Anstieg der Zellen in der G1-Phase beobachtet. Dabei war kein Unterschied zwischen lebenden und toten S4-Jena zu erkennen. Dagegen konnte nach Exposition mit dem TICE Stamm eine Abnahme der Zellen in der G2/M-Phase mit einem Anstieg der Zellen in der S-Phase beobachtet werden. In der SubG1-Phase waren keine Unterschiede zu nicht exponierten Zellen zu erkennen.

Der Nachweis einer durch BCG induzierten Apoptose nach Exposition von Harnblasenkarzinomzellen ist bisher umstritten. Exponierte Wirtszellen wehren sich gegen die Beladung mit Bakterien, indem sie zielgerichtet die betroffenen Zellen durch Apoptose abtöten. Die Exposition von Monozyten mit dem BCG Pasteur Stamm 1011 führte ausschließlich nach Induktion einer Apoptose, nicht einer Nekrose/Onkose, zu einem Abtöten der intrazellulären Bakterien ¹⁶⁴.

Die Exposition von MB49 Zellen mit TICE BCG induzierte einen Caspase-unabhängigen Zelltod ¹⁶³. Eine andere Studie konnte einen Anstieg von apoptotischen Zellen in T24 und J82 Zellen nach Exposition mit BCG detektieren ¹⁶⁵. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass für die Detektion von apoptotischen Zellen eine Kombination aus mehreren Tests notwendig ist, um alle Stadien der Apoptose zu erfassen. Es konnte gezeigt werden, dass Zelllinien, welche nicht in der Lage waren, BCG zu internalisieren, auch keine zytotoxischen Effekte aufwiesen ¹⁵⁵. Nach der Transfektion von $\alpha 5$ Integrin, was zu einer erhöhten Anzahl von internalisierten BCG führte, konnte ein Anstieg von toten Zellen verzeichnet werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte im Rasterelektronenmikroskop gezeigt werden, dass sich schon 1 h nach Exposition der T24 Zellen mit S4-Jena und TICE Stämmen (lebende und abgetötete) die Zellen morphologisch veränderten. Die Zellen fingen an sich vom Zellverband zu lösen und zeigten deutlich erste Anzeichen von Apoptose. Sie rundeten sich ab und es bildeten sich zytoplasmatische Abschnürungen, sogenannte Membranblebs. Auch nach 24 h ist ein ähnliches Bild zu erkennen. Das kann darauf zurück geführt werden, dass sich abgetötete Zellen ablösen und ins Medium übergehen. Es ist daher vorstellbar, dass diese Zellen nicht mehr in die Analyse mit eingebunden wurden. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen konnte ebenfalls mittels LSM nachgewiesen werden, dass die T24 Zellen nach Exposition mit beiden BCG Stämmen apoptotisch wurden. So konnte mit verschiedenen Methoden eine Caspase3/7 Aktivierung sowie ein PS-Flip detektiert werden. Im frühen Stadium der Apoptose wird das Phosphatidylserin von der Innenseite auf die Außenseite der Membran transloziert ¹⁶⁶. Gegenfärbungen mit Propidiumiodid zeigten bereits abgestorbene Zellen. Diese Ergebnisse konnten in der durchflusszytometrischen Analyse bestätigt werden. Auslöser der Apoptose war eine vorangegangene Internalisierung der BCG. So zeigten Zellen in Rasterelektronenmikroskopie-Aufnahmen, dass sie BCG aktiv aufnahmen. Die betroffenen Zellen rundeten sich ab und bildeten Blebs. Diese Ergebnisse konnten in LSM Aufnahmen wiederum bestätigt werden. Dabei war deutlich erkennbar, dass die Zellen, welche BCG internalisierten, nicht mehr konfluent waren, sondern sich abrundeten.

4.3 Molekulare Prognosefaktoren

$\alpha 5\beta 1$ Integrin/ IL-6: Wie schon in Kapitel 3.2 diskutiert, spielt die Adhärenz und Internalisierung der BCG eine entscheidende Rolle bei der Karzinomantwort. In einer Studie wurde der Zusammenhang zwischen der Rezeptordichte von $\alpha 5\beta 1$ Integrin und dem Ansprechen der BCG Therapie untersucht ⁵⁵. Die Studie umfasste zwar ein relativ kleines Patientenkollektiv von 17 Patienten, jedoch versagte die Vorhersage von Nonresponder oder Responder einer BCG-Therapie nur bei einem Patienten. Eine autokrine IL-6 Produktion erhöht die Expression von $\alpha 5\beta 1$ Integrin über die Aktivierung von NF- κ B ¹⁶⁷. Dabei ist eine Überexpression von IL-6 mit einem Anstieg der Zelloberflächenexpression des $\alpha 5\beta 1$ -Integrin Rezeptors assoziiert ¹⁶⁸. FAP vermittelt unter anderem die Internalisierung von BCG in die Epithelzellen durch den $\alpha 5\beta 1$ -Integrin

Rezeptor^{135,136,145,155,169,170}. Durch die Zugabe von anti- $\alpha 5\beta 1$ -Integrin konnte die Internalisierung von Connaught BCG in MGH Zellen gehemmt, jedoch nicht verhindert werden¹⁵⁵. Es konnte gezeigt werden, dass die Internalisierung unter anderem von der Expression des $\alpha 5$ -Integrin Genes abhängig ist. Nach der Transfektion von $\alpha 5$ -Integrin in eine BCG Nonresponder Zelllinie, war eine erhöhte Internalisierung von BCG sowie ein Anstieg von toten Zellen zu verzeichnen¹⁵⁵. Ein Modell der Internalisierung ist in Abbildung 52 dargestellt.

Diese Aussagen stehen jedoch im Widerspruch mit einem Teil der in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse. Es konnte gezeigt werden, dass TICE nach Exposition der Cal29 Zellen eine geringe Adhärenz- und Internalisierungsrate aufwiesen. Weiterhin kam es zu keiner Proliferationshemmung der Zellen oder einem Anstieg der Apoptoserate. Bei den Cal29 Zellen war nach Exposition mit TICE keine Erhöhung der IL-6 Expression nachweisbar. Im Gegenteil, die Exposition mit abgetöteten TICE führte bei den Cal29 Zellen nach 12 h zu einer Inhibierung der IL-6 Expression. Jedoch waren ein Anstieg der $\beta 1$ -Integrin Expression und eine Abnahme der $\alpha 5$ -Integrin Expression messbar.

Im Vergleich dazu kam es nach Exposition der T24 Zellen mit S4-Jena oder TICE zu einer Verringerung der $\beta 1$ -Integrin Expression. Jedoch war kein Unterschied im $\alpha 1$ -Integrin Expressionslevel zu finden. Die Exposition mit den beiden Stämmen führte bei den T24 Zellen zu einer hohen Internalisierungsrate mit anschließender Proliferationshemmung und einem Anstieg der Apoptoserate. Die Exposition mit lebenden sowie abgetöteten S4-Jena führte bei den T24 Zellen zu einer signifikant erhöhten Expression von IL-6. Dagegen konnte ausschließlich nach Exposition mit lebenden, nicht mit abgetöteten TICE eine Erhöhung der IL-6 Expression in T24 Zellen nachgewiesen werden. Der Nachweis einer erhöhten IL-6 Expression könnte damit ein wichtiger molekularer Prognosemarker sein.

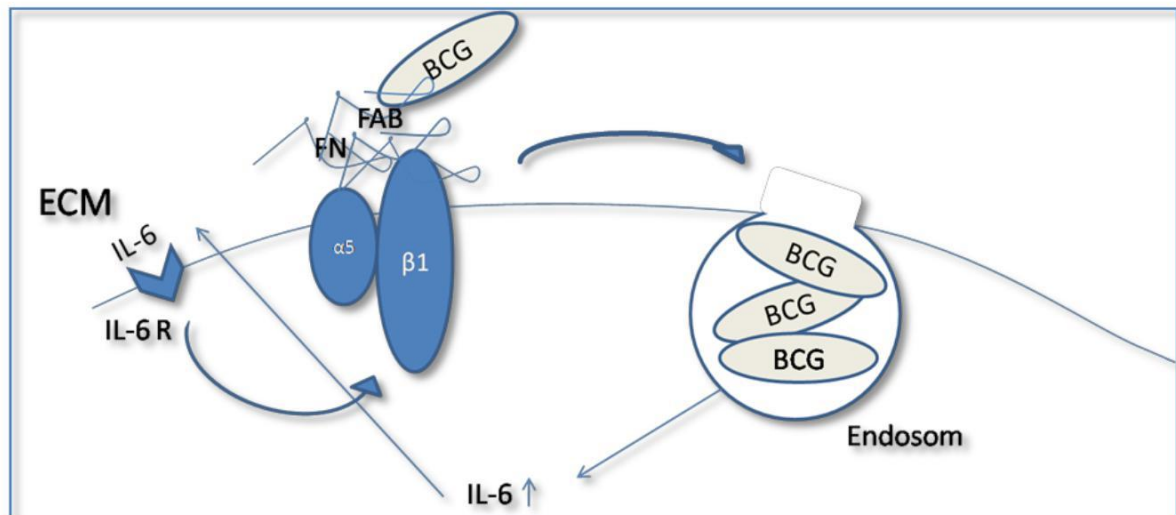


Abbildung 52: Model für den Effekt der BCG induzierten IL-6 Expression auf die $\alpha 5 \beta 1$ Integrin Expression und BCG Adhärenz.

Schritt 1: BCG bindet an Karzinomzellen. Schritt 2: BCG Bindung induziert IL-6 Expression. Schritt 3: IL-6 bindet an den transmembranen Rezeptor. Schritt 4: IL-6/Rezeptor Interaktion führt zum Anstieg der Karzinomzellexpression von $\alpha 5$ and $\beta 1$ Integrin. Schritt 5: Anstieg der $\alpha 5 \beta 1$ Integrin Expression führt zum Anstieg der BCG Bindung¹⁶⁸.

E2F3: Der Transkriptionsfaktor E2F3 ist ein Mitglied einer Gruppe von Proteinen (E2Fs), welche eine zentrale Rolle in der Kontrolle des Zellzyklus spielen. Die Überexpression von *E2F3* wird mit einem invasiven Karzinomwachstum, rascher Karzinomzellproliferation und schlechter Differenzierung in Verbindung gebracht¹⁷¹⁻¹⁷³. Phosphorylierung von RB1 durch CDKs führt zur Dissoziation des RB1/E2F3- Komplexes und dadurch zum Übergang der Zelle von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus [Qian et al., 1992; Hurst et al., 2008]. In der vorliegenden Arbeit führte die Exposition von T24 Zellen mit dem S4-Jena Stamm zu einer hoch signifikanten Inhibierung der Genexpression von E2F3. Dies hätte zur Folge, dass es zu einem Arrest in der G1-Phase kommen würde.

EGFR: Das Protoonkogen EGFR (epidermal growth factor receptor) gehört zur Superfamilie der Rezeptor-Tyrosinkinasen und wird an der Oberfläche von Epithelzellen exprimiert^{174,175}. Die Aktivierung des EGFR Signalweges führt zur Angiogenese, Zellproliferation und Apoptoseinhibierung¹⁷⁶. Eine Überexpression von EGFR korreliert mit einem verkürzten rezidivfreien Überleben, mit einem schlechteren Differenzierungsgrad und mit einem fortgeschrittenem klinischen Stadium des Karzinoms¹⁷⁷⁻¹⁷⁹. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass nach Exposition der Cal29 Zellen mit TICE über den gesamten Zeitraum von 24 h die Genexpression von EGFR sank. Dabei war keine Proliferationsinhibierung nachweisbar. Dagegen stieg die EGFR Expression 24 h nach Exposition der T24 Zellen mit S4-Jena. Hier zeigte sich jedoch

eine Proliferationsinhibierung um ca. 40 – 50 %. Aus diesen Ergebnissen kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass Veränderungen von EGFR keine direkten Auswirkungen auf den Therapieerfolg durch BCG aufweisen.

HMGB1: HMGB1 (high molecular group box protein 1) ist ein Mitglied der „nonhistone, chromatin-associated high-mobility“ Proteinfamilie ¹⁸⁰. Während der zellularen Homöostase ist HMGB1 vorwiegend im Zellkern lokalisiert. Die nukleären Funktionen von HMGB1 sind essentiell für das Leben, bereits 24 h nach der Geburt von HMGB1 defizienten knockout Mäusen sterben diese an Unterzuckerung. Zelllinien, denen das Gen *hmgb1* fehlt wachsen normal, jedoch ist die Aktivierung der Genexpression des Glycocorticoid Rezeptors gestört ¹⁸¹. Die Exposition der Zelllinien T24 und 253J mit TICE führte zu einem Anstieg von HMGB1 im Medium. Damit soll es eine Rolle in der Antikarzinomantwort von BCG spielen ¹⁸². In der vorliegenden Studie kam es lediglich nach Exposition von Cal29 Zellen mit TICE zu einem Anstieg der Genexpression von HMGB1. Dagegen führte die Exposition der T24 Zellen mit S4-Jena zu einer Reduktion des Genexpressionslevels von HMGB1. Damit ist auch HMGB1 kein aussagekräftiger theranostischer Marker für die BCG Therapie.

Survivin: Survivin (auch als *birc5* oder *api4* bekannt) ist ein Mitglied der Familie Apoptose hemmender Proteine ¹⁸³. Es inhibiert Apoptose, indem es Caspase3 und Caspase7 bindet ¹⁸⁴. Dieses Gen ist in vielen Arten von Karzinomen wie Lungen-, Darm-, Brust-, Prostata- sowie Harnblasenkarzinomen hochreguliert ^{183,185}. Es ist generell nicht in enddifferenziertem Gewebe detektierbar ⁴⁶. Jedoch korreliert in Neuroblastomen, Brust-, Lungen-, Darm- und Harnblasenkarzinomen der Nachweis von Survivin mit einer kurzen Überlebenszeit des Patienten und/oder mit einem schnellen Rezidiv ¹⁸⁵⁻¹⁸⁸. Bei NMIBC wird Survivin als theranostischer Prognosefaktor für das Risiko eines Rezidives sowie der Progression in ein nächst höheres Stadium diskutiert. Verschiedene Autoren konnten nachweisen, dass der Urinlevel von Survivin der Karzinompatienten mit deren Überlebensrate korreliert. So konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von Survivin zu einer schlechteren Prognose führte ^{189,190}.

Untersuchungen an der T24 Zelllinie mit Survivin siRNA zeigte eine dramatische Inhibierung der Proliferationsrate und die spontane Zellapoptose war stark erhöht ¹⁹¹. Ebenfalls konnte an der T24 Zelllinie ein antiproliferativer Effekt und eine verstärkte Apoptose mit Inhibierung der Survivin Expression durch Flawokawain A gezeigt werden ¹⁹². In der hepatozellulären Karzinomzelllinie HepG2 kam es nach Behandlung mit

Tamoxifen zu einer Proliferationsinhibierung mit Zellzyklusarrest in der G0/G1-Phase, welche mit einem Rückgang der Survivin Expression verbunden war ¹⁹³. In Pankreaskarzinomzelllinien führte die Behandlung mit Kurkumin, dem Lebensmittelzusatzstoff E100, zu einer Reduktion der Survivin Genexpression, was zu einer Proliferationsinhibierung und Apoptose führte ¹⁹⁴. In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass nach Exposition mit S4-Jena die Expression von Survivin signifikant in den T24 sowie den Cal29 Zellen sank. Dagegen sank die Survivin Expression nach Exposition mit dem TICE Stamm nur in den T24 Zellen. Bei den Cal29 Zellen war nach Exposition mit TICE ein 4facher Anstieg der Survivin Expression zu verzeichnen. Daher kann davon ausgegangen werden, dass nach Exposition und Internalisierung der BCG die Expression von Survivin beeinflusst wird. Dies stellt einen initialen Schritt für die Apoptose dar. Die Ergebnisse korrelieren mit dem Proliferations- und Apoptoseverhalten. Bezugnehmend auf diesen Daten kann davon ausgegangen werden, dass die Inhibierung der Survivin Genexpression durch BCG einer der ausschlaggebenden Prognosefaktoren bei der „Karzinomtherapie“ ist und als theranostischer Marker verwendet werden kann.

IL-8: BCG Instillation induziert eine Interleukin IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17 und CSF2 Sekretion durch die exponierten Urothelzellen ^{152,195}. Das Zytokin IL-8 spielt als Entzündungsfaktor sowie in der Angiogenese eine wichtige Rolle. Im Urin von Patienten mit einem Harnblasenkarzinom kann ein signifikant erhöhter IL-8 Level im Vergleich zu gesunden Probanden beobachtet werden. Die erhöhte IL-8 Konzentration korreliert dabei mit einem steigenden Karzinomstadium ¹⁹⁶. Es finden sich in der Literatur allerdings gegensätzliche Studienergebnisse zu der IL-8 Konzentration im Urin von Patienten nach BCG-Instillation. Es zeigte sich, dass ein hoher Level der IL-8 Produktion in einem frühen Behandlungsstadium mit einer besseren klinischen Antwort auf BCG assoziiert ist ^{197,198}. In anderen Studien konnte dagegen kein Zusammenhang zwischen der IL-8 Urinkonzentration und der BCG-Response erkannt werden ^{199,200}. Eine erhöhte IL-8 Konzentration steht in Wechselbeziehung mit der Schwere der bakteriellen Exposition ²⁰¹. Die Exposition mit TICE BCG führte bei beiden Zelllinien zu einem Anstieg der IL-8 Expression. Dagegen konnte nach Exposition mit dem S4-Jena Stamm lediglich bei lebenden Bakterien in der T24 Zelllinie ein Anstieg verzeichnet werden. Diese Ergebnisse werfen die Frage auf, ob der TICE Stamm in der Cal29 Zelllinie, über die Auslösung einer heftigen Immunantwort doch noch als Responder eingeteilt werden könnte.

TP53/ MDM2: Die Ingenuity Software zeigt im Signalweg „bladder cancer“ Gene, welche in biologisch relevante, zelluläre Prozesse beim Harnblasenkarzinom involviert sind. Zahlreiche Studien untersuchten die Zusammenhänge zwischen dem Tumorsuppressorgen TP53 und dem Harnblasenkarzinom. Das Protoonkogen MDM2 ist in einer Vielzahl von Karzinomen überexprimiert u.a. auch im Harnblasenkarzinom²⁰². MDM2 besitzt die Fähigkeit an TP53 zu binden. Dies führt zu dessen Inaktivierung^{203,204}. Das *mdm2*-Gen ist auch ein Transkriptionstarget von TP53, wodurch ein autoregulatorischer „Feedback“-Loop entsteht und es seinen eigenen negativen Regulator aktiviert^{132,205}. Unter normalen Wachstumsbedingungen liegt MDM2 als Phosphoprotein vor und kann so den Abbau des Tp53 Proteins vermitteln. Der trimere p53-MDM2-pRB-Komplex scheint die p53-abhängigen Transkriptionsrepressionsfunktionen wiederherzustellen und ist in der Lage, die Apoptose zu induzieren²⁰⁶. Die Exposition mit abgetöteten S4-Jena führte zu einem Anstieg der MDM2 Expression in T24 Zellen. Dies führte zu einer Inhibierung von TP53. Dagegen sank die MDM2 Expression in Cal29 Zellen nach Exposition mit dem TICE Stamm. Diese Ergebnisse stehen in Widerspruch mit der Literatur. Eine Inhibierung des MDM2 Levels, ungeachtet des p53 Status, reduziert die Proliferation und bewirkt einen Anstieg der Apoptoserate in Prostatakarzinomzelllinien²⁰⁷.

HRAS: 1981 wurde das erste humane Onkogen, ein mutiertes HRas, aus urothelialen Karzinomzelllinien isoliert²⁰⁸. Seitdem wurden immer mehr neuentdeckte Onkogene oder Karzinomsuppressorgene in ihrer Rolle beim urothelialen Karzinom untersucht. HRas ist ein Mitglied der RAS-Familie und gehört zur Superfamilie der GTPasen. Es spielt eine zentrale Rolle in verschiedenen Signaltransduktionswegen u.a. in Wachstums- und Differenzierungsprozessen.

In der T24 Zelllinie kommt es zu einer Aktivierung von HRas durch eine Punktmutation²⁰⁹⁻²¹¹. Das Vorhandensein von Mutationen des HRas Genes in Harnblasenkarzinomen steht nicht in einem Zusammenhang mit dem Karzinomgrad und/oder dem Stadium^{212,213}. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression von HRas nach Exposition mit S4-Jena in der T24 sowie in der Cal29 Zelllinie sank. Dagegen führte die Exposition der Cal29 Zellen mit TICE zu einem Anstieg der HRas Expression.

MHC-1: Um vom zellulären Teil des Immunsystems erkannt zu werden, müssen Peptide aus Tumorantigenen von MHC-Molekülen präsentiert werden. Die MHC-1 Expression wird in vielen Karzinomarten oftmals herunterreguliert²¹⁴. Somit können sie von den zytotoxischen T-Lymphozyten nicht mehr erkannt werden²¹⁵⁻²¹⁷. Im Harnblasenkarzinom ist eine Reduktion der MHC-1 Expression mit einer schlechten Überlebensrate assoziiert²¹⁴. Nach Exposition der beiden Harnblasenkarzinomzelllinien mit lebenden S4-Jena und TICE wurde signifikant nach 24 h MHC-1 hochreguliert. Das hätte *in vivo* zur Folge, dass exponierte Zellen vom Immunsystem erkannt und eliminiert werden. In Patientenstudien konnte bestätigt werden, dass die BCG Therapie des NMIBC zu einer signifikanten Erhöhung des MHC-1 Levels im Urin führt²¹⁸. Dagegen führte die Exposition der T24 und Cal29 Zellen mit abgetöteten BCG zu keiner Erhöhung der MHC-1 Expression. Im Gegenteil, die Exposition der T24 Zellen mit S4-Jena führte zu einer Erniedrigung der Genexpression von MHC-1. Dadurch würde bei der Therapie des NMIBC mit abgetöteten BCG das Immunsystem wahrscheinlich die Exposition mit BCG nicht erkennen. Wodurch die Karzinomzellen nicht zusätzlich durch das Immunsystem eliminiert werden.

CFH (HF1): Der Komplementfaktor H wird nach Exposition mit Mikroorganismen in den Blutkreislauf sekretiert. Es spielt eine essentielle Rolle in der Aktivierung des Komplementsystems und der damit verbundenen Schutzmechanismen nach bakteriellen Expositionen. Die Exposition mit beiden, lebenden und abgetöteten BCG, führte nach der Exposition beider Zelllinien zu einer signifikanten Reduktion der CFH Expression. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die BCG durch die Hemmung der CFH Ausschüttung in den Blutkreislauf das Immunsystem umgehen können.

4.4 Mycolactonnachweis

Im Rahmen dieser Dissertation wurden erste Versuche zum Toxinnachweis von BCG unternommen. Dabei wurde die nahe Verwandtschaft zwischen den *M. ulcerans* Stamm und BCG in Betracht gezogen. Die Infektion mit *M. ulcerans* führt zu einer Erkrankung namens Buruli Ulkus (BU). Für diesen BU ist das Toxin Mycolacton A/B verantwortlich. Es führt zunächst zu einem einzelnen subkutanen Bläschen. Im zweiten Stadium platzt die Haut darüber auf und wird nekrotisch, es bilden sich tiefe Ulcera mit typischen, unterminierten Wundrändern. Als eine mögliche Impfkomplication mit BCG kann es an

der Einstichstelle zu einem Knötchen kommen mit anschließender Ulceration nach ca. 2 Wochen^{219,220}. Diese Ulcera zeigen einen purulenten unterminierten erythematösen Wundrand, welcher ebenfalls für die dermale Erkrankung des Buruli Ulkus (BU) charakteristisch ist. Ebenfalls wurde von Ulcerationen des Darms^{221,222} und des Penis nach TUR mit anschließender BCG Behandlung berichtet^{223,224}.

Mycolacton A/B ist das aktivste und am weitesten verbreitet Mycolacton. Es ist charakteristisch für *M. ulcerans* Stämme aus Afrika. Experimente mit aufgereinigten Mycolacton A/B zeigten eine intensive zytotoxische Aktivität in vitro. Dies betrifft Monozyten, Makrophagen, Lymphozyten, Fibroblasten, Epithelzellen uvm^{118,225,226}. Die Zytotoxizität von Mycolacton kann auf apoptotische Aktivität zurückgeführt werden. Apoptose konnte in verschiedenen Zelltypen, welche mit aufgereinigten Mycolacton versetzt wurden, nachgewiesen werden²²⁵.

Zum Nachweis von Mycolacton-ähnlichen Toxinen wurde unter anderem eine HSQC NMR Spektrometrie von BCG erstellt. Dieses Spektrum wurde mit denen in der Literatur beschriebenen Spektren von Mycolacton A/B verglichen. Die Abbildung 49 zeigt ein HSQC NMR Spektrum eines *M. ulcerans* Stammes aus der Arbeit von Mahrous *et al.*¹¹⁶. In diesem Spektrum ist der Macrolide Ring (ganzer Kreis) und die Seitenkette (gestrichelter Kreis) von Mycolacton A/B zu erkennen. Bei den *M. ulcerans* Mutanten, welche ein Defizit in der Mycolacton Biosynthese aufweisen, ist ein verändertes HSQC NMR Spektrum erkennbar. Es fehlte das Signal für die Seitenkette bei der MU1615A Mutante und bei der Mutante MU1615::Tn104 fehlten die Signale für die Seitenkette und den Makrolidring¹¹⁶. Ein ähnliches Spektrum des Makrolidringes sowie der Seitenketten konnten in dieser Arbeit auch bei den BCG Stämmen in der HSQC NMR nachgewiesen werden (Abbildung 50). Das lässt vermuten, dass Mycolacton-ähnliche Polyketide auch von BCG synthetisiert werden und einen wichtigen Beitrag bei dem Zelltod nach Exposition der Karzinomzellen mit BCG spielen. Anhand einer Massenspektrometrie wurde die relative Konzentration von Mycolacton-ähnlichen Substanzen in BCG S4-Jena und dem TICE Stamm nachgewiesen. Weiterhin wurde nach Exposition mit den beiden Stämmen anhand der Zelllinien T24 und Cal29 die relative Konzentration von BCG Mycolacton bestimmt. Dabei wurden die Zellen nach Exposition mit BCG aufgereinigt und der Mycolacton Gehalt ermittelt. Die Cal29 Zelllinie zeigte nach Exposition mit dem TICE Stamm keine bzw. eine geringe Konzentration an Mycolacton. Jedoch war nach Exposition mit dem S4-Jena Stamm eine relativ hohe Konzentration des Toxins nachweisbar. Dies

scheint im direkten Zusammenhang mit der geringen Proliferationshemmung und Apoptoserate von Cal29 Zellen nach Exposition mit dem TICE Stamm zu stehen. Da auch die Internalisierungsrate der TICE BCG in diesen Zellen geringer ausfiel als mit dem S4-Jena Stamm, kann davon ausgegangen werden, dass dieses Toxin unter anderem für das Absterben der Karzinomzellen verantwortlich ist.

4.5 Therapeutische Perspektive des BCG Stammes S4-Jena

Bisherige Studien zur Therapie des NMIBC konnten die Überlegenheit der BCG Therapie gegenüber Zytostatika darlegen. Jedoch scheinen sich in den letzten Jahren vermehrt Schwierigkeiten der BCG Produktion zu entwickeln. Seit der Verbreitung des BCG Stammes hatten die BCG Tochterstämme weitere 1.000 Kultivierungspassagen durchlaufen. Meist waren diese Passagen unter Konditionen erfolgt, die die ursprüngliche Attenuierung beeinflusste ²²⁷. Dagegen wurde der S4-Jena Stamm von Anfang an weiter kontinuierlich nach den Protokollen von Calmette und Guérin kultiviert. In den letzten 20 Jahren wurde der S4-Jena Stamm nicht weiter kultiviert und im lyophilisierten Zustand aufbewahrt, somit erfolgten keine weiteren Kultivierungspassagen.

Aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der S4-Jena dem TICE Stamm, im Bezug auf das therapeutische Potential bei den beiden untersuchten Harnblasenkarzinomzelllinien, überlegen ist. Der TICE Stamm wurde aus einer Gruppe von „veralteten“ BCG ausgewählt, da diese Gruppe sich durch eine hohe Anzahl von Deletionen auszeichnet ⁹³.

Die Arbeitsgruppe von Hanna *et al.* ²²⁸ hatte am Meerschweinmodell die Entwicklung von Lymphknotenmetastasen beobachtet. Dafür hatte er nach der Exzision der intrakutan wachsenden Leberzellkarzinome die Tiere mit „fresh frozen“ und lyophilisierten BCG Stämmen behandelt. Im Ergebnis der Studie konnte gezeigt werden, dass die Lymphknotengröße sowie Metastasenanzahl geringer bei den „fresh frozen“ behandelten Tieren ausfiel. Der TICE Stamm wurde in dieser Studie als lyophilisiertes Präparat von der Firma Apogepha erworben und in physiologischer NaCl-Lösung für die Untersuchungen verwendet. Dagegen wurde der S4-Jena Stamm direkt als „fresh frozen“ Kultur sowie nach dem Protokoll von Calmette und Guérin verwendet. Da der BCG Stamm S4-Jena bei den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten nicht als Lyophilisat eingesetzt wurde, müssten Patientenstudien mit lyophilisierten S4-Jena durchgeführt werden, um einen

endgültigen Beweis des besseren therapeutischen Potentials gegenüber TICE zu bekommen. Zum jetzigen Zeitpunkt war es am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Jena noch nicht möglich eine pharmakologisch standardisierte Lyophilisierung des S4-Jena Stammes durchzuführen.

4.6 Ausblick

Obwohl die adjuvante Therapie des NMIBC mit BCG eine etablierte Verfahrensweise nach TUR ist, ist der Wirkmechanismus bis heute nicht ausreichend bekannt. Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse sind geeignet, den Wirkmechanismus der BCG Therapie des NMIBC besser zu verstehen und können eine Grundlage für den gezielten Einsatz von BCG bei sensitiven Karzinomen bilden.

Des Weiteren stellen die Ergebnisse dieser Arbeit eine Grundlage für den gezielten Einsatz der BCG Therapie des NMIBC zur Selektivierung von Nonresponder- und Responder-Karzinomen dar. Ein weiteres Ziel der Forschung sollten nun Bemühungen sein, einen fokussierten Nonresponder/ Responder Array für die Therasosik des NMIBC zu entwickeln. Als Grundlage könnten hierfür die in dieser Arbeit bereits erhaltenen Gensignaturen genutzt werden.

5 Zusammenfassung

Die adjuvante intravesikale Therapie des nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms (NMIBC) mit dem *Mykobakterium bovis* ssp. Bacillus-Calmette-Guérin (BCG) ist nach EAU Guideline der Goldstandard bei „high-grade“ Karzinomen. Die molekularen Wirkmechanismen der BCG Therapie auf die Harnblasenkarzinomzellen sind jedoch nach wie vor ungeklärt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, diese Mechanismen der BCG Therapie aufzuklären und des Weiteren den S4-Jena Stamm mit einem kommerziell erhältlichen (TICE) in Hinblick auf die potentielle therapeutische Wirksamkeit anhand der Effekte auf zwei Karzinomzelllinien zu vergleichen.

Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Erkenntnisse zeigen, dass die Therapie der NMIBC mit dem Mycobakterium BCG einen direkten Einfluss auf Karzinomzellen hat und nicht auf einer alleinigen indirekten Immunstimulierung beruht (Abbildung 53). So ist im ersten Schritt die Adhärenz und nachfolgende Internalisierung der BCG in die Karzinomzellen von essentieller Bedeutung. T24 Zellen internalisieren BCG S4-Jena sowie TICE bereits nach zwei Stunden. Dabei gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen lebenden und abgetöteten BCG. Jedoch konnte bei der Cal29 Zelllinie lediglich nach Exposition mit BCG S4-Jena eine Internalisierung nachgewiesen werden. Dagegen zeigten die TICE BCG bei der Cal29 Zelllinie zwar eine Adhärenz, doch keine Internalisierung. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Internalisierung der BCG durch die Zellen aktiv erfolgt und zu einer Proliferationsinhibierung der Zellen führt. Es konnte hier erstmals eindeutig mittels verschiedener Methoden nachgewiesen werden, dass die Proliferationsinhibierung auf Apoptose beruht. Die Apoptose-Induktion korrelierte dabei mit der IL-6 Expression, was wiederum die Internalisierung von BCG in andere Karzinomzellen triggert. BCG S4-Jena zeigte dabei im Gegensatz zu TICE einen Einfluss auf beide Zelllinien. Der Einschluss der BGC in Endosomen der Karzinomzellen führt zu einer Umwandlung dieser in Lysosomen bei einem erniedrigten pH Wert von 4,5 -5. Durch die Erniedrigung des pH-Wertes kommt es zur vermehrten Synthese von Mycolacton, das für die Apoptose-Induktion verantwortlich sein könnte. Auch bei der Mycolaton-Synthese zeigte S4-Jena einen stärkeren Effekt als TICE. Mit dem Nachweis von Mycolacton in BCG konnte in dieser Arbeit der erste Hinweis auf ein wesentliches Toxin von *M. bovis* gezeigt werden.

Durch den stärkeren apoptotischen Effekt von BCG S4-Jena auf beide untersuchten Karzinomzelllinien im Gegensatz zu TICE, kann davon ausgegangen werden, dass S4-Jena für die Therapie besser geeignet ist als TICE und möglicherweise auch andere zur Zeit kommerziell erhältliche BCG-Stämme. Weiterführende Untersuchungen zur kommerziellen Verwendung von S4-Jena zur adjuvanten intravesikalen Therapie des NMIBC sind daher anzuraten.

Weiterhin stellen die in dieser Arbeit bereits erhaltenen Gensignaturen eine Grundlage für den gezielten Einsatz der BCG Therapie des NMIBC zur Selektivierung von Nonresponder- und Responder-Patienten und damit einer verbesserten therapeutischen Versorgung dar. Ein weiteres Ziel der Forschung sollten nun Bemühungen sein, einen fokussierten Nonresponder/Responder Array für die Theranostik des NMIBC zu entwickeln.

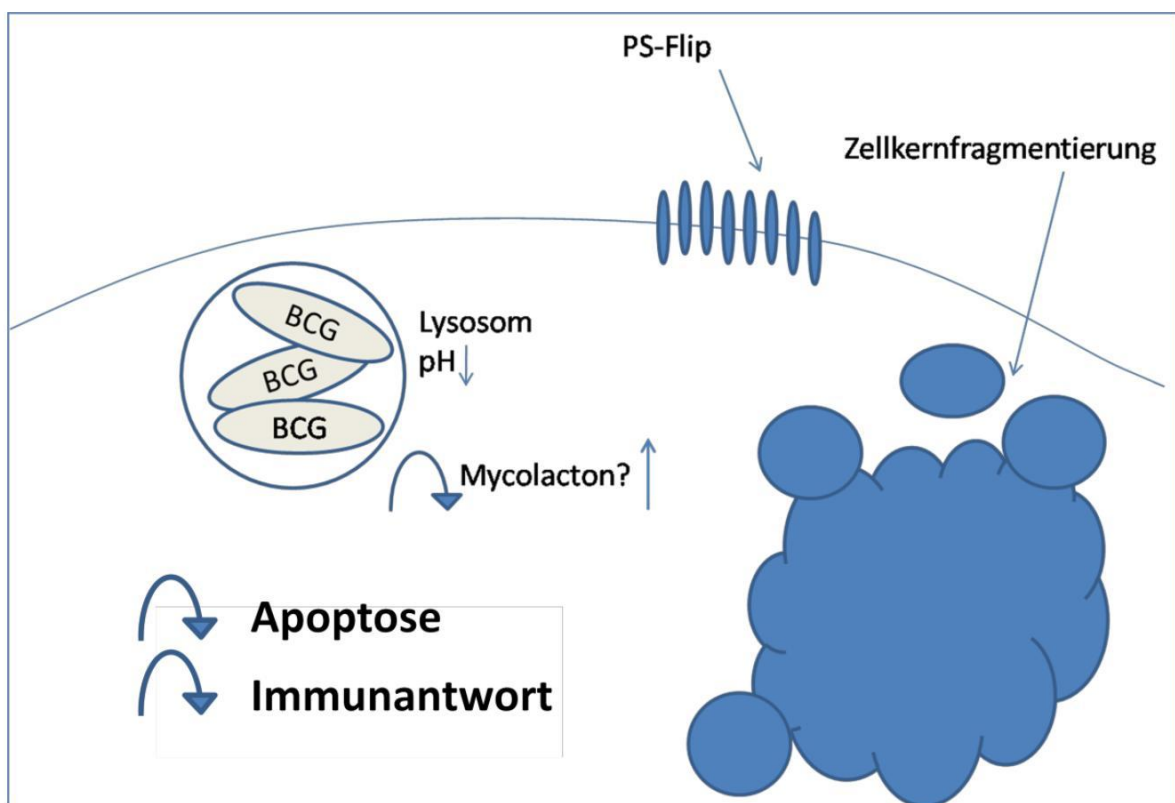


Abbildung 53: Schema der Wirkweise von BCG auf Karzinomzellen

Nach erfolgter Internalisierung der BCG in die Karzinomzellen werden die BCG in Lysosomen mit einem pH-Wert von 4,5 – 5 eingeschlossen. Durch das saure Milieu in den Lysosomen kommt es zu einer vermehrten Mycolactonproduktion, welches eine Apoptose der Karzinomzellen auslöst.

Abstract

The adjuvant intravesical therapy of non-muscle-invasive bladder cancer with mycobacteria bovis ssp. BCG is the gold standard for treatment of “high-grade” cancer according to EAU guideline. The effects of BCG therapy on bladder cancer on molecular level are poorly understood. The aim of the present dissertation was to elucidate the mechanisms of BCG therapy and the comparison of the S4-Jena BCG strain with a commercially available BCG strain TICE in respect of efficacy in two bladder cancer cell lines as a model.

The findings of the present dissertation show, that the exposition of non-muscle-invasive bladder cancer to BCG has a direct impact on cancer cells and is not based on indirect immune stimulation exclusively (figure 53). The first essential step is the adherence and followed by internalization of BCG into the bladder cancer cells. T24 cells internalize BCG S4-Jena and TICE as early as after two hours. There was significant difference between living and heat-inactivated BCG. For the Cal29 cell line internalization was demonstrated only after exposition with S4-Jena BCG. In contrast TICE BCG showed only adherence but no internalization to Cal29 cells. Furthermore it could be demonstrated that the internalization of BCG by the cells is an active process. This process leads to inhibition of cell proliferation. As demonstrated by various methods this process is mainly based on apoptosis. The induction of apoptosis is correlated with IL-6 expression and triggers the internalization of BCG in other bladder cancer cells. In contrast to TICE BCG S4-Jena influences both cell lines. The inclusion of BCG into the cancer cell endosomes leads to their transformation into lysosomes with a decreased pH of 4,5-5. Because of the decreased pH the mycolactone synthesis is stimulated, which is could be responsible for apoptosis. Regarding the mycolacton synthesis S4-Jena BCG also showed a greater effect than TICE. The detection of mycolactons in BCG is a first evidence of a toxin in *M. bovis* ssp. BCG.

The greater apoptotic effect of BCG S4-Jena on both examined cancer cell lines proves that S4-Jena is better suitable than TICE and probably other commercially available BCG strains. Further investigations regarding the commercial use of S4-Jena for the adjuvant intravesical therapy of NMIBC should be realized.

Furthermore the gene signature of BCG exposed cells reveals a base for the specific application of BCG in the adjuvant intravesical therapy of NMIBC to differentiate between responders and non-responders. Another aim of research should be the development of focused responder/non-responder array for the theranostic of NMBIC.

Literatur

1. Ploeg, M., Aben, K.K. & Kiemeny, L.A. The present and future burden of urinary bladder cancer in the world. *World J Urol* 27, 289-293 (2009).
2. Holzel, D. & Altwein, J.E. [Tumors of the urogenital tract: clinico-epidemiologic facts]. *Urologe A* 30, 134-138 (1991).
3. Ferlay J, B.F., Pisani P, Parkin DM. Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. *IARC CancerBase : IARC Press 2001* No. 5. Lyon(2001).
4. Giersiepen, W. & Batzler, K. Krebs in Deutschland 2003-2004, Häufigkeiten und Trends. Technical report, eine gemeinschaftliche Veröffentlichung des Robert-Koch-Institutes und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.,Berlin. (2008).
5. Lutzeyer, W., Rubben, H. & Dahm, H. Prognostic parameters in superficial bladder cancer: an analysis of 315 cases. *J Urol* 127, 250-252 (1982).
6. Silverman, D.T., Hartge, P., Morrison, A.S. & Devesa, S.S. Epidemiology of bladder cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 6, 1-30 (1992).
7. Hautmann, R. & Huland, H. *Urologie Springer Medizin Verlag, Heidelberg* (2006).
8. Jemal, A., et al. Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin* 57, 43-66 (2007).
9. Howe, H.L., et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2003, featuring cancer among U.S. Hispanic/Latino populations. *Cancer* 107, 1711-1742 (2006).
10. Zeegers, M.P., Tan, F.E., Dorant, E. & van Den Brandt, P.A. The impact of characteristics of cigarette smoking on urinary tract cancer risk: a meta-analysis of epidemiologic studies. *Cancer* 89, 630-639 (2000).
11. Negri, E. & La Vecchia, C. Epidemiology and prevention of bladder cancer. *Eur J Cancer Prev* 10, 7-14 (2001).
12. Brennan, P., et al. The contribution of cigarette smoking to bladder cancer in women (pooled European data). *Cancer Causes Control* 12, 411-417 (2001).
13. Brennan, P., et al. Cigarette smoking and bladder cancer in men: a pooled analysis of 11 case-control studies. *Int J Cancer* 86, 289-294 (2000).
14. Boffetta, P. Tobacco smoking and risk of bladder cancer. *Scand J Urol Nephrol Suppl*, 45-54 (2008).
15. Tyczynski, J. & Parkin, D. BLADDER CANCER IN EUROPE. *ENCR* <http://www.encl.com.fr/bladder-factsheets.pdf> (2003).
16. La Vecchia, C. & Airoidi, L. Human bladder cancer: epidemiological, pathological and mechanistic aspects. *IARC Sci Publ*, 139-157 (1999).
17. Moolgavkar, S.H. & Stevens, R.G. Smoking and cancers of bladder and pancreas: risks and temporal trends. *J Natl Cancer Inst* 67, 15-23 (1981).
18. Travis, L.B., et al. Bladder and kidney cancer following cyclophosphamide therapy for non-Hodgkin's lymphoma. *J Natl Cancer Inst* 87, 524-530 (1995).
19. Jankovic, S. & Radosavljevic, V. Risk factors for bladder cancer. *Tumori* 93, 4-12 (2007).
20. Thiede, T. & Christensen, B.C. [Bladder tumors induced by chlornaphazine treatment]. *Ugeskr Laeger* 137, 661-666 (1975).
21. Fernandes, E.T., Manivel, J.C., Reddy, P.K. & Ercole, C.J. Cyclophosphamide associated bladder cancer--a highly aggressive disease: analysis of 12 cases. *J Urol* 156, 1931-1933 (1996).
22. Morrison, A.S. Advances in the etiology of urothelial cancer. *Urol Clin North Am* 11, 557-566 (1984).
23. Yosry, A. Schistosomiasis and neoplasia. *Contrib Microbiol* 13, 81-100 (2006).
24. Kantor, A.F., et al. Urinary tract infection and risk of bladder cancer. *Am J Epidemiol* 119, 510-515 (1984).
25. Dolin, P.J., Darby, S.C. & Beral, V. Paraplegia and squamous cell carcinoma of the bladder in young women: findings from a case-control study. *Br J Cancer* 70, 167-168 (1994).

26. Melzak, J. The incidence of bladder cancer in paraplegia. *Paraplegia* 4, 85-96 (1966).
27. Dorp, F.v.K., Ingo; Jocham, Dieter. Diagnostik und Therapie des nichtinvasiven Harnblasenkarzinoms: Teil 2 der Serie zum Harnblasenkarzinom. *Dtsch Arztebl* 104(12): A-797 / B-702 / C-676(2007).
28. A. Bannowsky, J.A.S., J. H. Egberts, H. Stübinger, F. J. Martinez y Portillo, K.-P. Jünemann. Das mesonephroide Adenokarzinom –eine seltene Neoplasie der Harnblase *J für Urologie und Urogynäkologie* 11(2)(2004).
29. Seitz, M., Zaak, D., Knuchel-Clarke, R. & Stief, C. [Urinary bladder tumours. The new 2004 WHO classification]. *Urologe A* 44, 1073-1086 (2005).
30. Lindemann-Docter, K. & Knuchel-Clarke, R. [Histopathology of urothelial carcinomas: crucial for patient management]. *Urologe A* 47, 627-636; quiz 637 (2008).
31. Rübben, H. Harnblasenkarzinom Auftakt zur Artikel-Serie. *deutsches arzteblatt* 104, A718 (2007).
32. Dorp, F., Kausch, I. & Jocham, D. Diagnostik und Therapie des nichtinvasiven Harnblasenkarzinoms: Teil 2 der Serie zum Harnblasenkarzinom. *Dtsch Arztebl* 104(12), 104(112) (2007).
33. Botteman, M.F., Pashos, C.L., Redaelli, A., Laskin, B. & Hauser, R. The health economics of bladder cancer: a comprehensive review of the published literature. *Pharmacoeconomics* 21, 1315-1330 (2003).
34. Lokeshwar, V.B., *et al.* Bladder tumor markers beyond cytology: International Consensus Panel on bladder tumor markers. *Urology* 66, 35-63 (2005).
35. Alvarez, A. & Lokeshwar, V.B. Bladder cancer biomarkers: current developments and future implementation. *Curr Opin Urol* 17, 341-346 (2007).
36. Sarosdy, M.F., *et al.* Use of a multitarget fluorescence in situ hybridization assay to diagnose bladder cancer in patients with hematuria. *J Urol* 176, 44-47 (2006).
37. van Rhijn, B.W., van der Poel, H.G. & van der Kwast, T.H. Urine markers for bladder cancer surveillance: a systematic review. *Eur Urol* 47, 736-748 (2005).
38. Agarwal, P.K., Black, P.C. & Kamat, A.M. Considerations on the use of diagnostic markers in management of patients with bladder cancer. *World J Urol* 26, 39-44 (2008).
39. Black, P.C., Brown, G.A. & Dinney, C.P. Molecular markers of urothelial cancer and their use in the monitoring of superficial urothelial cancer. *J Clin Oncol* 24, 5528-5535 (2006).
40. Pode, D., *et al.* Noninvasive detection of bladder cancer with the BTA stat test. *J Urol* 161, 443-446 (1999).
41. Grossman, H.B., *et al.* Surveillance for recurrent bladder cancer using a point-of-care proteomic assay. *JAMA* 295, 299-305 (2006).
42. Hautmann, S., *et al.* [Tumor markers for bladder cancer: up-to-date study by the Kiel Tumor Bank]. *Urologe A* 46, 1508-1513 (2007).
43. Lokeshwar, V.B. & Selzer, M.G. Urinary bladder tumor markers. *Urol Oncol* 24, 528-537 (2006).
44. Kramer, M.W., *et al.* HYAL-1 hyaluronidase: a potential prognostic indicator for progression to muscle invasion and recurrence in bladder cancer. *Eur Urol* 57, 86-93 (2010).
45. Lokeshwar, V.B., Cerwinka, W.H. & Lokeshwar, B.L. HYAL1 hyaluronidase: a molecular determinant of bladder tumor growth and invasion. *Cancer Res* 65, 2243-2250 (2005).
46. Shariat, S.F., *et al.* Survivin expression is associated with bladder cancer presence, stage, progression, and mortality. *Cancer* 109, 1106-1113 (2007).
47. Shariat, S.F., *et al.* Survivin as a prognostic marker for urothelial carcinoma of the bladder: a multicenter external validation study. *Clin Cancer Res* 15, 7012-7019 (2009).
48. Nouraei, N., *et al.* Expression of survivin and its spliced variants in bladder tumors as a potential prognostic marker. *Urol J* 6, 101-108 (2009).

49. Atlasi, Y., Mowla, S.J. & Ziaee, S.A. Differential expression of survivin and its splice variants, survivin-DeltaEx3 and survivin-2B, in bladder cancer. *Cancer Detect Prev* 32, 308-313 (2009).
50. Jager, T., *et al.* [Use of silicon chip technology to detect protein-based tumor markers in bladder cancer]. *Urologe A* 46, 1152-1156 (2007).
51. Bringuier, P.P., *et al.* Decreased E-cadherin immunoreactivity correlates with poor survival in patients with bladder tumors. *Cancer Res* 53, 3241-3245 (1993).
52. Helpap, B., *et al.* Molecular pathology of non-invasive urothelial carcinomas (part I). *Virchows Arch* 442, 309-316 (2003).
53. Fradet, Y., Lafleur, L. & LaRue, H. Strategies of chemoprevention based on antigenic and molecular markers of early and premalignant lesions of the bladder. *J Cell Biochem Suppl* 161, 85-92 (1992).
54. Kim, Y.J., *et al.* Gene signatures for the prediction of response to bacillus calmette-guerin immunotherapy in primary pT1 bladder cancers. *Clin Cancer Res* 16, 2131-2137 (2010).
55. Gazzaniga, P., *et al.* A chemosensitivity test to individualize intravesical treatment for non-muscle-invasive bladder cancer. *BJU Int* 104, 184-188 (2009).
56. Babjuk, M., *et al.* EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder. *Eur Urol* 54, 303-314 (2008).
57. Nepple, K.G., Aubert, H.A., Braasch, M.R. & O'Donnell, M.A. Combination of BCG and interferon intravesical immunotherapy: an update. *World J Urol* 27, 343-346 (2009).
58. Nseyo, U.O. Photodynamic therapy in the management of bladder cancer. *J Clin Laser Med Surg* 14, 271-280 (1996).
59. Pan, H., Ma, X., Chen, J. & Jiang, H. PDT combined with Intravesical BCG instillation would form an autovaccine for bladder cancer? *Med Hypotheses* 73, 559-560 (2009).
60. Berger, A.P., *et al.* Photodynamic therapy with intravesical instillation of 5-aminolevulinic acid for patients with recurrent superficial bladder cancer: a single-center study. *Urology* 61, 338-341 (2003).
61. Shackley, D.C., *et al.* Photodynamic therapy for superficial bladder cancer under local anaesthetic. *BJU Int* 89, 665-670 (2002).
62. Nseyo, U.O., *et al.* Photodynamic therapy (PDT) in the treatment of patients with resistant superficial bladder cancer: a long-term experience. *J Clin Laser Med Surg* 16, 61-68 (1998).
63. Lamm, D.L., *et al.* A randomized trial of intravesical doxorubicin and immunotherapy with bacille Calmette-Guerin for transitional-cell carcinoma of the bladder. *N Engl J Med* 325, 1205-1209 (1991).
64. Di Marco, A., Dasdia, T. & Pastori, W. Interaction of calcium ions and cAMP on the cytotoxic effect of doxorubicin. *Tumori* 70, 217-221 (1984).
65. Ross, W.E., Glaubiger, D.L. & Kohn, K.W. Protein-associated DNA breaks in cells treated with adriamycin or ellipticine. *Biochim Biophys Acta* 519, 23-30 (1978).
66. Carvalho, C., *et al.* Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. *Curr Med Chem* 16, 3267-3285 (2009).
67. Yourtee, D.M., Elkins, L.L., Nalvarte, E.L. & Smith, R.E. Amplification of doxorubicin mutagenicity by cupric ion. *Toxicol Appl Pharmacol* 116, 57-65 (1992).
68. Sylvester, R.J., van der Meijden, A.P., Witjes, J.A. & Kurth, K. Bacillus calmette-guerin versus chemotherapy for the intravesical treatment of patients with carcinoma in situ of the bladder: a meta-analysis of the published results of randomized clinical trials. *J Urol* 174, 86-91; discussion 91-82 (2005).
69. de Reijke, T.M., *et al.* Bacillus Calmette-Guerin versus epirubicin for primary, secondary or concurrent carcinoma in situ of the bladder: results of a European Organization for the Research and Treatment of Cancer--Genito-Urinary Group Phase III Trial (30906). *J Urol* 173, 405-409 (2005).
70. Gofrit, O.N., *et al.* The natural history of bladder carcinoma in situ after initial response to bacillus Calmette-Guerin immunotherapy. *Urol Oncol* 27, 258-262 (2009).

71. Althausen, A.F., Prout, G.R., Jr. & Daly, J.J. Non-invasive papillary carcinoma of the bladder associated with carcinoma in situ. *J Urol* 116, 575-580 (1976).
72. Palou, J., *et al.* Intravesical bacille Calmette-Guerin in the treatment of carcinoma in situ or high-grade superficial bladder carcinoma after radiotherapy for bladder carcinoma. *BJU Int* 83, 429-431 (1999).
73. Davis, J.W., Sheth, S.I., Doviak, M.J. & Schellhammer, P.F. Superficial bladder carcinoma treated with bacillus Calmette-Guerin: progression-free and disease specific survival with minimum 10-year followup. *J Urol* 167, 494-500; discussion 501 (2002).
74. Sylvester, R.J., *et al.* Long-Term Efficacy Results of EORTC Genito-Urinary Group Randomized Phase 3 Study 30911 Comparing Intravesical Instillations of Epirubicin, Bacillus Calmette-Guerin, and Bacillus Calmette-Guerin plus Isoniazid in Patients with Intermediate- and High-Risk Stage Ta T1 Urothelial Carcinoma of the Bladder. *Eur Urol* (2009).
75. Lingnau, A., *et al.* [Postoperative and adjuvant intravesical therapy of superficial bladder tumours. Clinical practice and applied therapeutic agents]. *Aktuelle Urol* 40, 307-309 (2009).
76. Otto, T., Krege, S., Noll, F. & Rubben, H. Therapy of superficial bladder carcinomas. *Urol Int* 63, 32-39 (1999).
77. Zlotta, A.R., *et al.* Evolution and clinical significance of the T cell proliferative and cytokine response directed against the fibronectin binding antigen 85 complex of bacillus Calmette-Guerin during intravesical treatment of superficial bladder cancer. *J Urol* 157, 492-498 (1997).
78. Simons, M.P., O'Donnell, M.A. & Griffith, T.S. Role of neutrophils in BCG immunotherapy for bladder cancer. *Urol Oncol* 26, 341-345 (2008).
79. Luo, Y., Yamada, H., Evanoff, D.P. & Chen, X. Role of Th1-stimulating cytokines in bacillus Calmette-Guerin (BCG)-induced macrophage cytotoxicity against mouse bladder cancer MBT-2 cells. *Clin Exp Immunol* 146, 181-188 (2006).
80. Brandau, S., *et al.* In vitro generation of bacillus Calmette-Guerin-activated killer cells. *Clin Infect Dis* 31 Suppl 3, S94-S100 (2000).
81. Lattime, E.C., Gomella, L.G. & McCue, P.A. Murine bladder carcinoma cells present antigen to BCG-specific CD4+ T-cells. *Cancer Res* 52, 4286-4290 (1992).
82. Ikeda, N., Toida, I., Iwasaki, A., Kawai, K. & Akaza, H. Surface antigen expression on bladder tumor cells induced by bacillus Calmette-Guerin (BCG): A role of BCG internalization into tumor cells. *Int J Urol* 9, 29-35 (2002).
83. Prescott, S., Jackson, A.M., Hawkyard, S.J., Alexandroff, A.B. & James, K. Mechanisms of action of intravesical bacille Calmette-Guerin: local immune mechanisms. *Clin Infect Dis* 31 Suppl 3, S91-93 (2000).
84. Jansson, O.T., *et al.* The role of nitric oxide in bacillus Calmette-Guerin mediated anti-tumour effects in human bladder cancer. *Br J Cancer* 78, 588-592 (1998).
85. Morales, A., Eidinger, D. & Bruce, A.W. Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors. *J Urol* 116, 180-183 (1976).
86. Herr, H.W. & Morales, A. History of bacillus Calmette-Guerin and bladder cancer: an immunotherapy success story. *J Urol* 179, 53-56 (2008).
87. Pearl, R. Cancer and tuberculosis. *Am J Hygiene* 9, 97 (1929).
88. Old, L.J., Clarke, D.A. & Benacerraf, B. Effect of Bacillus Calmette-Guerin infection on transplanted tumours in the mouse. *Nature* 184(Suppl 5), 291-292 (1959).
89. Zbar, B., Bernstein, I.D. & Rapp, H.J. Suppression of tumor growth at the site of infection with living Bacillus Calmette-Guerin. *J Natl Cancer Inst* 46, 831-839 (1971).
90. Mathe, G., Pouillart, P. & Lapeyraque, F. Active immunotherapy of L1210 leukaemia applied after the graft of tumour cells. *Br J Cancer* 23, 814-824 (1969).
91. Morton, D., Eilber, F.R., Malmgren, R.A. & Wood, W.C. Immunological factors which influence response to immunotherapy in malignant melanoma. *Surgery* 68, 158-163; discussion 163-154 (1970).
92. Coe, J.E. & Feldman, J.D. Extracutaneous delayed hypersensitivity, particularly in the guinea-pig bladder. *Immunology* 10, 127-136 (1966).

93. Brosch, R., *et al.* Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 5596-5601 (2007).
94. Behr, M.A. & Small, P.M. A historical and molecular phylogeny of BCG strains. *Vaccine* 17, 915-922 (1999).
95. Harboe, M., *et al.* Properties of proteins MPB64, MPB70, and MPB80 of *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun* 52, 293-302 (1986).
96. Mahairas, G.G., Sabo, P.J., Hickey, M.J., Singh, D.C. & Stover, C.K. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *J Bacteriol* 178, 1274-1282 (1996).
97. Zureck, A. [30 Years of BCG-vaccination in GDR - 30 years of BCG-vaccine production in Jena]. *Z Erkr Atmungsorgane* 158, 168-184 (1982).
98. Vogelstein, B. & Kinzler, K.W. The multistep nature of cancer. *Trends Genet* 9, 138-141 (1993).
99. O'Connor, P.M. Mammalian G1 and G2 phase checkpoints. *Cancer Surv* 29, 151-182 (1997).
100. Dash, B.C. & El-Deiry, W.S. Cell cycle checkpoint control mechanisms that can be disrupted in cancer. *Methods Mol Biol* 280, 99-161 (2004).
101. B. Alberts, A.J., J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter. Molecular biology of the cell. *Taylor & Francis, New York* (2002).
102. Larsson, O., Zetterberg, A. & Engstrom, W. Cell-cycle-specific induction of quiescence achieved by limited inhibition of protein synthesis: counteractive effect of addition of purified growth factors. *J Cell Sci* 73, 375-387 (1985).
103. Campisi, J. & d'Adda di Fagagna, F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 729-740 (2007).
104. C. Wagener, O.M. Molekulare Onkologie. *Thieme Medical Publishers* (2009).
105. Witzel, II, Koh, L.F. & Perkins, N.D. Regulation of cyclin D1 gene expression. *Biochem Soc Trans* 38, 217-222 (2010).
106. Johnson, D.G. & Walker, C.L. Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39, 295-312 (1999).
107. Kim, J.K. & Diehl, J.A. Nuclear cyclin D1: an oncogenic driver in human cancer. *J Cell Physiol* 220, 292-296 (2009).
108. Jurisicova, A., Varmuza, S. & Casper, R.F. Programmed cell death and human embryo fragmentation. *Mol Hum Reprod* 2, 93-98 (1996).
109. Kroemer, G., Petit, P., Zamzami, N., Vayssiere, J.L. & Mignotte, B. The biochemistry of programmed cell death. *FASEB J* 9, 1277-1287 (1995).
110. Thompson, C.B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267, 1456-1462 (1995).
111. Yau, P. Apoptosis. *The Science Creative Quarterly* August, www.scq.ubc.ca/apoptosis/ (2004).
112. Messam, C.A. & Pittman, R.N. Asynchrony and commitment to die during apoptosis. *Exp Cell Res* 238, 389-398 (1998).
113. Testa, U. TRAIL/TRAIL-R in hematologic malignancies. *J Cell Biochem* 110, 21-34.
114. Berger, K. Die Herstellung des BCG-Impstoffes. *Zeitschrift für Hygiene* 136, 1-18 (1953).
115. Cassar, L., Li, H., Jiang, F.X. & Liu, J.P. TGF-beta induces telomerase-dependent pancreatic tumor cell cycle arrest. *Mol Cell Endocrinol* 320, 97-105.
116. Mahrous, E.A., Lee, R.B. & Lee, R.E. A rapid approach to lipid profiling of mycobacteria using 2D HSQC NMR maps. *J Lipid Res* 49, 455-463 (2008).
117. Hong, H., Stinear, T., Porter, J., Demangel, C. & Leadlay, P.F. A novel mycolactone toxin obtained by biosynthetic engineering. *Chembiochem* 8, 2043-2047 (2007).
118. Hong, H., Demangel, C., Pidot, S.J., Leadlay, P.F. & Stinear, T. Mycolactones: immunosuppressive and cytotoxic polyketides produced by aquatic mycobacteria. *Nat Prod Rep* 25, 447-454 (2008).

119. Tenover, F.C., *et al.* Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 33, 2233-2239 (1995).
120. Bohle, A., Jocham, D. & Bock, P.R. Intravesical bacillus Calmette-Guerin versus mitomycin C for superficial bladder cancer: a formal meta-analysis of comparative studies on recurrence and toxicity. *J Urol* 169, 90-95 (2003).
121. Lamm, D.L., *et al.* Incidence and treatment of complications of bacillus Calmette-Guerin intravesical therapy in superficial bladder cancer. *J Urol* 147, 596-600 (1992).
122. Michelet, N., *et al.* [BCG infection of the glans penis after intravesical BCG therapy]. *Ann Dermatol Venereol* 135, 479-483 (2008).
123. Yoshida, R., Kawasaki, H., Miyajima, A., Amagai, M. & Ohyama, M. Primary tuberculosis of the penis after intravesical bacillus Calmette-Guerin instillation therapy. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 23, 77-78 (2009).
124. Latini, J.M., Wang, D.S., Forgacs, P. & Bihrl, W., 3rd. Tuberculosis of the penis after intravesical bacillus Calmette-Guerin treatment. *J Urol* 163, 1870 (2000).
125. Husain-Syed, F. & Velcovsky, H.G. [BCGitis.]. *Dtsch Med Wochenschr* 131, 877-878 (2006).
126. Allouc, H., Benoit, G., Paradis, V., Blanchet, P. & Jardin, A. [Risk of complications during endovesical treatment with BCG for superficial tumor of the bladder]. *Presse Med* 26, 1284-1288 (1997).
127. Rosevear, H.M., Lightfoot, A.J., O'Donnell, M.A. & Griffith, T.S. The role of neutrophils and TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in bacillus Calmette-Guerin (BCG) immunotherapy for urothelial carcinoma of the bladder. *Cancer Metastasis Rev* 28, 345-353 (2009).
128. Ratliff, T.L., Palmer, J.O., McGarr, J.A. & Brown, E.J. Intravesical Bacillus Calmette-Guerin therapy for murine bladder tumors: initiation of the response by fibronectin-mediated attachment of Bacillus Calmette-Guerin. *Cancer Res* 47, 1762-1766 (1987).
129. Zhao, W., *et al.* Role of a bacillus Calmette-Guerin fibronectin attachment protein in BCG-induced antitumor activity. *Int J Cancer* 86, 83-88 (2000).
130. Finlay, B.B. & Cossart, P. Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. *Science* 276, 718-725 (1997).
131. Hauck, C.R., Agerer, F., Muenzner, P. & Schmitter, T. Cellular adhesion molecules as targets for bacterial infection. *Eur J Cell Biol* 85, 235-242 (2006).
132. Barak, Y., Juven, T., Haffner, R. & Oren, M. mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. *EMBO J* 12, 461-468 (1993).
133. Ratliff, T.L., McCarthy, R., Telle, W.B. & Brown, E.J. Purification of a mycobacterial adhesin for fibronectin. *Infect Immun* 61, 1889-1894 (1993).
134. Schorey, J.S., Holsti, M.A., Ratliff, T.L., Allen, P.M. & Brown, E.J. Characterization of the fibronectin-attachment protein of Mycobacterium avium reveals a fibronectin-binding motif conserved among mycobacteria. *Mol Microbiol* 21, 321-329 (1996).
135. Zhao, W., *et al.* Characterization of the fibronectin binding motif for a unique mycobacterial fibronectin attachment protein, FAP. *J Biol Chem* 274, 4521-4526 (1999).
136. Kavoussi, L.R., Brown, E.J., Ritchey, J.K. & Ratliff, T.L. Fibronectin-mediated Calmette-Guerin bacillus attachment to murine bladder mucosa. Requirement for the expression of an antitumor response. *J Clin Invest* 85, 62-67 (1990).
137. Durek, C., *et al.* Bacillus-Calmette-Guerin (BCG) and 3D tumors: an in vitro model for the study of adhesion and invasion. *J Urol* 162, 600-605 (1999).
138. Schneider, B., *et al.* Specific binding of bacillus Calmette-Guerin to urothelial tumor cells in vitro. *World J Urol* 12, 337-344 (1994).
139. Schorey, J.S., *et al.* A Mycobacterium leprae gene encoding a fibronectin binding protein is used for efficient invasion of epithelial cells and Schwann cells. *Infect Immun* 63, 2652-2657 (1995).

140. Hynes, R.O. & Yamada, K.M. Fibronectins: multifunctional modular glycoproteins. *J Cell Biol* 95, 369-377 (1982).
141. Kuusela, P., Vartio, T., Vuento, M. & Myhre, E.B. Attachment of staphylococci and streptococci on fibronectin, fibronectin fragments, and fibrinogen bound to a solid phase. *Infect Immun* 50, 77-81 (1985).
142. Vercellotti, G.M., et al. Bacterial adherence to fibronectin and endothelial cells: a possible mechanism for bacterial tissue tropism. *J Lab Clin Med* 103, 34-43 (1984).
143. Vaudaux, P., Suzuki, R., Waldvogel, F.A., Morgenthaler, J.J. & Nydegger, U.E. Foreign body infection: role of fibronectin as a ligand for the adherence of *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* 150, 546-553 (1984).
144. Laufer, M., Kaver, I., Sela, B. & Matzkin, H. Elevated urinary fibronectin levels after transurethral resection of bladder tumour: a possible role in patients failing therapy with bacillus Calmette-Guerin. *BJU Int* 84, 428-432 (1999).
145. Becich, M.J., Carroll, S. & Ratliff, T.L. Internalization of bacille Calmette-Guerin by bladder tumor cells. *J Urol* 145, 1316-1324 (1991).
146. Luo, Y., Szilvasi, A., Chen, X., DeWolf, W.C. & O'Donnell, M.A. A novel method for monitoring *Mycobacterium bovis* BCG trafficking with recombinant BCG expressing green fluorescent protein. *Clin Diagn Lab Immunol* 3, 761-768 (1996).
147. Akaza, H., et al. Expression of antitumor response. Role of attachment and viability of bacillus Calmette-Guerin to bladder cancer cells. *Cancer* 72, 558-563 (1993).
148. Bevers, R.F., de Boer, E.C., Kurth, K.H. & Schamhart, D.H. BCG-induced interleukin-6 upregulation and BCG internalization in well and poorly differentiated human bladder cancer cell lines. *Eur Cytokine Netw* 9, 181-186 (1998).
149. Zhang, Y., Khoo, H.E. & Esuvaranathan, K. Effects of bacillus Calmette-Guerin and interferon-alpha-2B on human bladder cancer in vitro. *Int J Cancer* 71, 851-857 (1997).
150. Rajala, P., et al. Cytostatic effect of different strains of *Bacillus Calmette-Guerin* on human bladder cancer cells in vitro alone and in combination with mitomycin C and interferon-alpha. *Urol Res* 20, 215-217 (1992).
151. Pryor, K., Stricker, P., Russell, P., Golovsky, D. & Penny, R. Antiproliferative effects of bacillus Calmette-Guerin and interferon alpha 2b on human bladder cancer cells in vitro. *Cancer Immunol Immunother* 41, 309-316 (1995).
152. Zhang, Y., Khoo, H.E. & Esuvaranathan, K. Effects of bacillus Calmette-Guerin and interferon alpha-2B on cytokine production in human bladder cancer cell lines. *J Urol* 161, 977-983 (1999).
153. Chen, F., Zhang, G., Iwamoto, Y. & See, W.A. BCG directly induces cell cycle arrest in human transitional carcinoma cell lines as a consequence of integrin cross-linking. *BMC Urol* 5, 8 (2005).
154. Sasaki, A., Kudoh, S., Mori, K., Takahashi, N. & Suzuki, T. Are BCG effects against urinary bladder carcinoma cell line T24 correlated with apoptosis in vitro? *Urol Int* 59, 142-148 (1997).
155. Pook, S.H., Rahmat, J.N., Esuvaranathan, K. & Mahendran, R. Internalization of *Mycobacterium bovis*, *Bacillus Calmette Guerin*, by bladder cancer cells is cytotoxic. *Oncol Rep* 18, 1315-1320 (2007).
156. Zhang, G., Chen, F., Cao, Y. & See, W.A. *Bacillus Calmette-Guerin* induces p21 expression in human transitional carcinoma cell lines via an immediate early, p53 independent pathway. *Urol Oncol* 25, 221-227 (2007).
157. Niculescu, A.B., 3rd, et al. Effects of p21(Cip1/Waf1) at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication. *Mol Cell Biol* 18, 629-643 (1998).
158. Sherr, C.J. & Roberts, J.M. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 9, 1149-1163 (1995).
159. Sherr, C.J. & Roberts, J.M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13, 1501-1512 (1999).

160. Gartel, A.L. & Tyner, A.L. The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Mol Cancer Ther* 1, 639-649 (2002).
161. Li, Y., Dowbenko, D. & Lasky, L.A. AKT/PKB phosphorylation of p21Cip/WAF1 enhances protein stability of p21Cip/WAF1 and promotes cell survival. *J Biol Chem* 277, 11352-11361 (2002).
162. Lai, Y.M., *et al.* Induction of cell cycle arrest and apoptosis by BCG infection in cultured human bronchial airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 293, L393-401 (2007).
163. Chen, F., Zhang, G., Cao, Y., Hessner, M.J. & See, W.A. MB49 murine urothelial carcinoma: molecular and phenotypic comparison to human cell lines as a model of the direct tumor response to bacillus Calmette-Guerin. *J Urol* 182, 2932-2937 (2009).
164. Molloy, A., Laochumroonvorapong, P. & Kaplan, G. Apoptosis, but not necrosis, of infected monocytes is coupled with killing of intracellular bacillus Calmette-Guerin. *J Exp Med* 180, 1499-1509 (1994).
165. Saitoh, H., *et al.* BCG effects on telomerase activity in bladder cancer cell lines. *Int J Clin Oncol* 7, 165-170 (2002).
166. Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H. & Reutelingsperger, C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 184, 39-51 (1995).
167. Chen, F., Zhang, G., Iwamoto, Y. & See, W.A. Bacillus Calmette-Guerin initiates intracellular signaling in a transitional carcinoma cell line by cross-linking alpha 5 beta 1 integrin. *J Urol* 170, 605-610 (2003).
168. Zhang, G.J., *et al.* Autocrine IL-6 production by human transitional carcinoma cells upregulates expression of the alpha5beta1 fibronectin receptor. *J Urol* 163, 1553-1559 (2000).
169. Hudson, M.A., Brown, E.J., Ritchey, J.K. & Ratliff, T.L. Modulation of fibronectin-mediated Bacillus Calmette-Guerin attachment to murine bladder mucosa by drugs influencing the coagulation pathways. *Cancer Res* 51, 3726-3732 (1991).
170. Kuroda, K., Brown, E.J., Telle, W.B., Russell, D.G. & Ratliff, T.L. Characterization of the internalization of bacillus Calmette-Guerin by human bladder tumor cells. *J Clin Invest* 91, 69-76 (1993).
171. Oeggerli, M., *et al.* E2F3 is the main target gene of the 6p22 amplicon with high specificity for human bladder cancer. *Oncogene* 25, 6538-6543 (2006).
172. Oeggerli, M., *et al.* E2F3 amplification and overexpression is associated with invasive tumor growth and rapid tumor cell proliferation in urinary bladder cancer. *Oncogene* 23, 5616-5623 (2004).
173. Feber, A., *et al.* Amplification and overexpression of E2F3 in human bladder cancer. *Oncogene* 23, 1627-1630 (2004).
174. Brandau, S. & Bohle, A. Bladder cancer. I. Molecular and genetic basis of carcinogenesis. *Eur Urol* 39, 491-497 (2001).
175. Pham, D., *et al.* Use of cigarette-smoking history to estimate the likelihood of mutations in epidermal growth factor receptor gene exons 19 and 21 in lung adenocarcinomas. *J Clin Oncol* 24, 1700-1704 (2006).
176. Mason, R.A., *et al.* EGFR pathway polymorphisms and bladder cancer susceptibility and prognosis. *Carcinogenesis* 30, 1155-1160 (2009).
177. Neal, D.E., *et al.* The epidermal growth factor receptor and the prognosis of bladder cancer. *Cancer* 65, 1619-1625 (1990).
178. Smith, K., Fennelly, J.A., Neal, D.E., Hall, R.R. & Harris, A.L. Characterization and quantitation of the epidermal growth factor receptor in invasive and superficial bladder tumors. *Cancer Res* 49, 5810-5815 (1989).
179. Messing, E.M. Clinical implications of the expression of epidermal growth factor receptors in human transitional cell carcinoma. *Cancer Res* 50, 2530-2537 (1990).
180. Thomas, J.O. & Travers, A.A. HMG1 and 2, and related 'architectural' DNA-binding proteins. *Trends Biochem Sci* 26, 167-174 (2001).

181. Calogero, S., *et al.* The lack of chromosomal protein Hmg1 does not disrupt cell growth but causes lethal hypoglycaemia in newborn mice. *Nat Genet* 22, 276-280 (1999).
182. See, W.A., *et al.* Bacille-Calmette Guerin induces caspase-independent cell death in urothelial carcinoma cells together with release of the necrosis-associated chemokine high molecular group box protein 1. *BJU Int* 103, 1714-1720 (2009).
183. Ambrosini, G., Adida, C. & Altieri, D.C. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 3, 917-921 (1997).
184. Tamm, I., *et al.* IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res* 58, 5315-5320 (1998).
185. Swana, H.S., Grossman, D., Anthony, J.N., Weiss, R.M. & Altieri, D.C. Tumor content of the antiapoptosis molecule survivin and recurrence of bladder cancer. *N Engl J Med* 341, 452-453 (1999).
186. Adida, C., Berrebi, D., Peuchmaur, M., Reyes-Mugica, M. & Altieri, D.C. Anti-apoptosis gene, survivin, and prognosis of neuroblastoma. *Lancet* 351, 882-883 (1998).
187. Islam, A., *et al.* High expression of Survivin, mapped to 17q25, is significantly associated with poor prognostic factors and promotes cell survival in human neuroblastoma. *Oncogene* 19, 617-623 (2000).
188. Tanaka, K., *et al.* Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 6, 127-134 (2000).
189. Karam, J.A., Lotan, Y., Ashfaq, R., Sagalowsky, A.I. & Shariat, S.F. Survivin expression in patients with non-muscle-invasive urothelial cell carcinoma of the bladder. *Urology* 70, 482-486 (2007).
190. Hausladen, D.A., Wheeler, M.A., Altieri, D.C., Colberg, J.W. & Weiss, R.M. Effect of intravesical treatment of transitional cell carcinoma with bacillus Calmette-Guerin and mitomycin C on urinary survivin levels and outcome. *J Urol* 170, 230-234 (2003).
191. Yang, D., *et al.* Therapeutic potential of siRNA-mediated combined knockdown of the IAP genes (Livin, XIAP, and Survivin) on human bladder cancer T24 cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 42, 137-144 (2010).
192. Zi, X. & Simoneau, A.R. Flavokawain A, a novel chalcone from kava extract, induces apoptosis in bladder cancer cells by involvement of Bax protein-dependent and mitochondria-dependent apoptotic pathway and suppresses tumor growth in mice. *Cancer Res* 65, 3479-3486 (2005).
193. Guo, R., Huang, Z., Shu, Y., Jin, S. & Ge, H. Tamoxifen inhibits proliferation and induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 via down-regulation of survivin expression. *Biomed Pharmacother* 63, 375-379 (2009).
194. Glienke, W., Maute, L., Wicht, J. & Bergmann, L. Curcumin inhibits constitutive STAT3 phosphorylation in human pancreatic cancer cell lines and downregulation of survivin/BIRC5 gene expression. *Cancer Invest* 28, 166-171 (2010).
195. Saban, M.R., *et al.* Discriminators of mouse bladder response to intravesical Bacillus Calmette-Guerin (BCG). *BMC Immunol* 8, 6 (2007).
196. Sheryka, E., Wheeler, M.A., Hausladen, D.A. & Weiss, R.M. Urinary interleukin-8 levels are elevated in subjects with transitional cell carcinoma. *Urology* 62, 162-166 (2003).
197. Thalmann, G.N., Dewald, B., Baggiolini, M. & Studer, U.E. Interleukin-8 expression in the urine after bacillus Calmette-Guerin therapy: a potential prognostic factor of tumor recurrence and progression. *J Urol* 158, 1340-1344 (1997).
198. Thalmann, G.N., *et al.* Urinary Interleukin-8 and 18 predict the response of superficial bladder cancer to intravesical therapy with bacillus Calmette-Guerin. *J Urol* 164, 2129-2133 (2000).
199. Sanchez-Carbayo, M., *et al.* Serial urinary IL-2, IL-6, IL-8, TNFalpha, UBC, CYFRA 21-1 and NMP22 during follow-up of patients with bladder cancer receiving intravesical BCG. *Anticancer Res* 21, 3041-3047 (2001).

200. Rabinowitz, R., Smith, D.S., Tiemann, D.D. & Hudson, M.A. Urinary interleukin-8/creatinine level as a predictor of response to intravesical bacillus Calmette-Guerin therapy in bladder tumor patients. *J Urol* 158, 1728-1731; discussion 1731-1722 (1997).
201. Marty, C., *et al.* Circulating interleukin-8 concentrations in patients with multiple organ failure of septic and nonseptic origin. *Crit Care Med* 22, 673-679 (1994).
202. Lianes, P., *et al.* Altered patterns of MDM2 and TP53 expression in human bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 86, 1325-1330 (1994).
203. Momand, J., Zambetti, G.P., Olson, D.C., George, D. & Levine, A.J. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 69, 1237-1245 (1992).
204. Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A. & Oren, M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 387, 296-299 (1997).
205. Wu, X., Bayle, J.H., Olson, D. & Levine, A.J. The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev* 7, 1126-1132 (1993).
206. Hsieh, J.K., *et al.* RB regulates the stability and the apoptotic function of p53 via MDM2. *Mol Cell* 3, 181-193 (1999).
207. Zhang, Z., Li, M., Wang, H., Agrawal, S. & Zhang, R. Antisense therapy targeting MDM2 oncogene in prostate cancer: Effects on proliferation, apoptosis, multiple gene expression, and chemotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 11636-11641 (2003).
208. Parada, L.F., Tabin, C.J., Shih, C. & Weinberg, R.A. Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus ras gene. *Nature* 297, 474-478 (1982).
209. Tabin, C.J. & Weinberg, R.A. Analysis of viral and somatic activations of the cH-ras gene. *J Virol* 53, 260-265 (1985).
210. Taparowsky, E., *et al.* Activation of the T24 bladder carcinoma transforming gene is linked to a single amino acid change. *Nature* 300, 762-765 (1982).
211. Der, C.J., Krontiris, T.G. & Cooper, G.M. Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the ras genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 3637-3640 (1982).
212. Theodorescu, D., Cornil, I., Sheehan, C., Man, M.S. & Kerbel, R.S. Ha-ras induction of the invasive phenotype results in up-regulation of epidermal growth factor receptors and altered responsiveness to epidermal growth factor in human papillary transitional cell carcinoma cells. *Cancer Res* 51, 4486-4491 (1991).
213. Knowles, M.A. & Williamson, M. Mutation of H-ras is infrequent in bladder cancer: confirmation by single-strand conformation polymorphism analysis, designed restriction fragment length polymorphisms, and direct sequencing. *Cancer Res* 53, 133-139 (1993).
214. Klein, B., Levin, I. & Klein, T. HLA class I antigen expression in human solid tumors. *Isr J Med Sci* 32, 1238-1243 (1996).
215. Algarra, I., Collado, A. & Garrido, F. Altered MHC class I antigens in tumors. *Int J Clin Lab Res* 27, 95-102 (1997).
216. Bijen, C.B., *et al.* The prognostic role of classical and nonclassical MHC class I expression in endometrial cancer. *Int J Cancer* 126, 1417-1427.
217. Garrido, F., *et al.* Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol Today* 18, 89-95 (1997).
218. Videira, P.A., *et al.* Efficacy of bacille Calmette-Guerin immunotherapy predicted by expression of antigen-presenting molecules and chemokines. *Urology* 74, 944-950 (2009).
219. Fritz, T.M. & Trueb, R.M. [BCG ulcer. Rapid healing with topical INH powder]. *Hautarzt* 53, 816-818 (2002).
220. Ferreira, A.A., *et al.* [BCG revaccination in school children: evolution of the lesion at the vaccination site between 48 hours and 10 weeks]. *J Pediatr (Rio J)* 78, 289-294 (2002).

221. Satge, D., Pommepuy, I., Hassan, T., Goburdhun, J. & Flejou, J.F. Ulcerative terminal ileitis after BCG therapy for bladder carcinoma. *Histopathology* 41, 266-268 (2002).
222. Geldmacher, H., Taube, C., Markert, U. & Kirsten, D.K. Nearly fatal complications of cervical lymphadenitis following BCG immunotherapy for superficial bladder cancer. *Respiration* 68, 420-421 (2001).
223. Baniel, J., Lev, Z., Engelstein, D. & Servadio, C. Penile edema and meatal ulceration after intravesical instillation with bacillus Calmette-Guerin. *Urology* 47, 932-934 (1996).
224. Hillyer, S. & Gulmi, F.A. Cutaneous BCG of the penis after intravesical therapy for bladder cancer: a case report in a 66-year-old male. *Can J Urol* 16, 4866-4869 (2009).
225. George, K.M., Pascopella, L., Welty, D.M. & Small, P.L. A Mycobacterium ulcerans toxin, mycolactone, causes apoptosis in guinea pig ulcers and tissue culture cells. *Infect Immun* 68, 877-883 (2000).
226. Oswald, E., Nougayrede, J.P., Taieb, F. & Sugai, M. Bacterial toxins that modulate host cell-cycle progression. *Curr Opin Microbiol* 8, 83-91 (2005).
227. Bohle, A., Suttman, H. & Brandau, S. [Effect mechanism of intravesical BCG immunotherapy of superficial bladder cancer]. *Urologe A* 45, 629-633, 635-626 (2006).
228. Hanna, M.G., Jr., Peters, L.C., Gutterman, J.U. & Hersh, E.M. Evaluation of BCG administered by scarification for immunotherapy of metastatic hepatocarcinoma in the guinea pig. *J Natl Cancer Inst* 56, 1013-1017 (1976).
229. Hermann, G., et al. Nationale guidelines for handling af blæretumorer i Danmark. <http://skejby.net/Webudgaven/DaBlaCa2010.htm> (2010).

6 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: CAMILLE GUÉRIN (LINKS) UND ALBERT CALMETTE (1921) ⁸⁶ , REM AUFNAHMEN DER BCG DES STAMMES S4-JENA.....	14
ABBILDUNG 2: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER APOPTOSE (MODIFIZIERT NACH YAU ¹¹¹).....	19
ABBILDUNG 3: TUBERKULOSE IMPFSTOFF DES BCG-INSTITUTES ZIMET IN JENA.	35
ABBILDUNG 4: PULSFELDGELELEKTROPHORESE-PROFIL DER GETESTETEN BCG-STÄMME.	36
ABBILDUNG 5: VENN DIAGRAMM DER SCHNITTMENGEN DER GENEXPRESSION DER T24 ZELLEN NACH EXPOSITION MIT S4-JENA.....	38
ABBILDUNG 6: HARNBLASENKARZINOM SIGNALWEG (INGENUITY-SOFTWARE) NACH EXPOSITION VON T24 ZELLEN MIT S4-JENA.	39
ABBILDUNG 7: VENN DIAGRAMM DER SCHNITTMENGEN DER GENEXPRESSION DER T24 ZELLEN NACH EXPOSITION MIT TICE.....	40
ABBILDUNG 8: HARNBLASENKARZINOM SIGNALWEG (INGENUITY-SOFTWARE) NACH EXPOSITION VON T24 ZELLEN MIT TICE.....	41
ABBILDUNG 9: VENN DIAGRAMM DER SCHNITTMENGEN DER GENEXPRESSION DER CAL29 ZELLEN NACH EXPOSITION MIT S4-JENA.....	42
ABBILDUNG 10: HARNBLASENKARZINOM SIGNALWEG (INGENUITY-SOFTWARE) NACH EXPOSITION VON CAL29 ZELLEN MIT S4-JENA	43
ABBILDUNG 11: VENN DIAGRAMM DER SCHNITTMENGEN DER GENEXPRESSION DER CAL29 ZELLEN NACH EXPOSITION MIT TICE.....	44
ABBILDUNG 12: HARNBLASENKARZINOM SIGNALWEG (INGENUITY-SOFTWARE) NACH EXPOSITION VON CAL29 ZELLEN MIT TICE.....	45
ABBILDUNG 13: ADHÄRENZ- UND INTERNALISIERUNGSVERHALTEN VON ABGETÖTETEN S4 JENA UND TICE NACH EXPOSITION VON T24 ZELLEN.....	49
ABBILDUNG 14: ADHÄRENZ- UND INTERNALISIERUNGSVERHALTEN VON LEBENDEN S4 JENA UND TICE NACH EXPOSITION VON T24 ZELLEN.	49
ABBILDUNG 15: LSM AUFNAHME VON T24 ZELLEN NACH EXPOSITION MIT S4-JENA.....	50
ABBILDUNG 16: REM AUFNAHME VON T24 ZELLEN NACH EXPOSITION MIT S4-JENA.	51
ABBILDUNG 17: REM AUFNAHME VON T24 ZELLEN NACH EXPOSITION MIT TICE.	51
ABBILDUNG 18: ADHÄRENZ- UND INTERNALISIERUNGSVERHALTEN VON LEBENDEN S4 JENA UND TICE NACH EXPOSITION VON CAL29 ZELLEN.....	52
ABBILDUNG 19: ADHÄRENZ- UND INTERNALISIERUNGSVERHALTEN VON LEBENDEN S4 JENA UND TICE NACH EXPOSITION VON CAL29 ZELLEN.....	53
ABBILDUNG 20: REM AUFNAHME VON CAL29 ZELLEN NACH EXPOSITION MIT S4-JENA.	54
ABBILDUNG 21: REM AUFNAHME VON CAL29 ZELLEN NACH EXPOSITION MIT S4-JENA.	54
ABBILDUNG 22: REM AUFNAHME VON CAL29 ZELLEN NACH EXPOSITION MIT TICE.	55
ABBILDUNG 23: EFFEKT DER EXPOSITION MIT ABGETÖTETEN S4-JENA BZW. TICE AUF DIE PROLIFERATION DER T24 ZELLEN.	56

ABBILDUNG 24: EFFEKT DER EXPOSITION MIT LEBENDEN S4-JENA BZW. TICE AUF DIE PROLIFERATION DER T24 ZELLEN.....	56
ABBILDUNG 25: EFFEKT DER EXPOSITION MIT ABGETÖTETE S4-JENA BZW. TICE AUF DIE PROLIFERATION DER CAL29 ZELLEN.....	57
ABBILDUNG 26: EFFEKT DER EXPOSITION MIT LEBENDEN S4-JENA BZW. TICE AUF DIE PROLIFERATION DER CAL29 ZELLEN.....	58
ABBILDUNG 27: ZELLZYKLUS G1/S CHECKPOINT-SIGNALWEG (INGENUITY-SOFTWARE) NACH EXPOSITION VON T24 ZELLEN MIT S4-JENA.	60
ABBILDUNG 28: ZELLZYKLUS G1/S CHECKPOINT-SIGNALWEG (INGENUITY-SOFTWARE)NACH EXPOSITION VON T24 ZELLEN MIT TICE.	60
ABBILDUNG 29: ZELLZYKLUS G2/M CHECKPOINT-SIGNALWEG (INGENUITY-SOFTWARE) NACH EXPOSITION VON T24 ZELLEN MIT S4-JENA.	61
ABBILDUNG 30: ZELLZYKLUS G2/M CHECKPOINT-SIGNALWEG (INGENUITY-SOFTWARE) NACH EXPOSITION VON T24 ZELLEN MIT TICE.	61
ABBILDUNG 31: DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSE DES ZELLZYKLUS NACH EXPOSITION DER T24 ZELLEN MIT S4-JENA.	63
ABBILDUNG 32: DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSE DES ZELLZYKLUS NACH EXPOSITION DER T24 ZELLEN MIT TICE.....	63
ABBILDUNG 33: ZELLZYKLUS G1/S CHECKPOINT-SIGNALWEG (INGENUITY-SOFTWARE) NACH EXPOSITION VON CAL29 ZELLEN MIT S4-JENA.	64
ABBILDUNG 34: ZELLZYKLUS G1/S CHECKPOINT-SIGNALWEG (INGENUITY-SOFTWARE) NACH EXPOSITION VON CAL29 ZELLEN MIT TICE.	64
ABBILDUNG 35: ZELLZYKLUS G2/M CHECKPOINT-SIGNALWEG (INGENUITY-SOFTWARE) NACH EXPOSITION VON T24 ZELLEN MIT S4-JENA.	65
ABBILDUNG 36: ZELLZYKLUS G2/M CHECKPOINT-SIGNALWEG (INGENUITY-SOFTWARE)NACH EXPOSITION VON CAL29 ZELLEN MIT TICE.	65
ABBILDUNG 37: DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSE DES ZELLZYKLUS NACH EXPOSITION DER CAL29 ZELLEN MIT S4-JENA.	66
ABBILDUNG 38: DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSE DES ZELLZYKLUS NACH EXPOSITION DER CAL29 ZELLEN MIT TICE.....	67
ABBILDUNG 39: DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSE DER APOPTOSEINDUKTION VON T24 ZELLEN NACH EXPOSITION MIT S4-JENA UND TICE.	70
ABBILDUNG 40: DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSE DER APOPTOSEINDUKTION VON CAL29 ZELLEN NACH EXPOSITION MIT S4-JENA UND TICE.	71
ABBILDUNG 41: LASER SCANNING MIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN DER APOPTOSEINDUKTION NACH EXPOSITION DER T24 ZELLEN MIT S4-JENA UND TICE.	73
ABBILDUNG 42: LASER SCANNING MIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN DER APOPTOSEINDUKTION NACH EXPOSITION DER CAL29 ZELLEN MIT S4-JENA UND TICE.	74
ABBILDUNG 43: LASER SCANNING MIKROSKOPISCHER NACHWEIS VON MITOCHONDRIENAKTIVITÄT.	75

ABBILDUNG 44: LASER SCANNING MIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN DER APOPTOSEINDUKTION IN KORRELATION MIT INTERNALISERTEN BCG.	76
ABBILDUNG 45: RASTERELEKTRONISCHE AUFNAHMEN DER APOPTOSEINDUKTION IN T24 ZELLEN NACH EXPOSITION MIT S4-JENA.....	77
ABBILDUNG 46: RASTERELEKTRONISCHE AUFNAHMEN DER APOPTOSEINDUKTION IN T24 ZELLEN NACH EXPOSITION MIT TICE.....	78
ABBILDUNG 47: RASTERELEKTRONISCHE AUFNAHMEN DER APOPTOSEINDUKTION IN CAL29 ZELLEN NACH EXPOSITION MIT S4-JENA.....	78
ABBILDUNG 48: RASTERELEKTRONISCHE AUFNAHMEN DER APOPTOSEINDUKTION IN CAL29 ZELLEN NACH EXPOSITION MIT TICE.....	79
ABBILDUNG 49: HSQC NMR SPEKTRUM VON M. ULCERANS STÄMMEN AUS DER ARBEIT VON MAHROUS ET AL.	80
ABBILDUNG 50: HSQC NMR SPEKTRUM EINER C13 MARKIERTEN S4-JENA BCG PROBE.....	81
ABBILDUNG 51: BCG STAMMBAUM.....	85
ABBILDUNG 52: MODEL FÜR DEN EFFEKT DER BCG INDUZIERTEN IL-6 EXPRESSION AUF DIE A5B1 INTEGRIN EXPRESSION UND BCG ADHÄRENZ.	94
ABBILDUNG 53: SCHEMA DER WIRKWEISE VON BCG AUF KARZINOMZELLEN	103
ABBILDUNG 54: SCHEMA DER STADIENEINTEILUNG DES HARNBLASENKARZINOMS	122
ABBILDUNG 55: ANZUCHTVERFAHREN DES BCG S4-JENA STAMMES IN DEN GLYZERIN- UND GALLE- GLYZERIN-RÖHRCHEN	122

7 Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: GENEXPRESSION NACH EXPOSITION VON T24 UND CAL29 ZELLEN MIT S4-JENA UND TICE	46
TABELLE 2: ZEITABHÄNGIGE IL-6 GENEXPRESSION NACH EXPOSITION MIT BCG.....	47
TABELLE 3: ZEITABHÄNGIGE A5-INTEGRIN GENEXPRESSION NACH EXPOSITION MIT BCG.	48
TABELLE 4: ZEITABHÄNGIGE B 1-INTEGRIN GENEXPRESSION NACH EXPOSITION MIT BCG.	48
TABELLE 5: MASSENSPEKTROMETRIE (MS)-PEAK DER BEKANNTEN MYCOLACTONE.	81
TABELLE 6: HPLC-MS SPEKTROMETRIE ZUR BESTIMMUNG DER MYCOLACTONKONZENTRATION IN T24 UND CAL29 ZELLEN NACH EXPOSITION MIT LEBENDEN BCG.	82
TABELLE 7 HPLC-MS SPEKTROMETRIE ZUR BESTIMMUNG DER MYCOLACTONKONZENTRATION VON S4-JENA UND TICE NACH INKUBATION IN PROBANDENURIN.....	83
TABELLE 8: TNM KLASSIFIKATION DES HARNBLASENKARZINOMS	121

8 Anhang

8.1 TNM Klassifikation

Tabelle 8: TNM Klassifikation des Harnblasenkarzinoms

Die TNM Klassifikation des Harnblasenkarzinoms entspricht den Vorgaben der WHO 2004

TNM-Klassifikation Zuordnung	
T Primärtumor	
TX	Keine Beurteilung möglich
T0	Kein Primärtumor
Ta	Nichtinvasives papilläres Urothelkarzinom
Tis	Carcinoma in situ
T1	Infiltration der Lamina propria
T1a	Oberhalb der Muscularis mucosae
T1b	Innerhalb/unterhalb der Muscularis mucosae; nicht etabliert
T2	Infiltration der Muscularis propria
T2a	Innere Hälfte
T2b	Äußere Hälfte
T3	Infiltration des Perivesikalen Fettgewebes
T3a	Mikroskopisch erkennbar
T3b	Makroskopisch erkennbar
T4	Infiltration anderer Organe
T4a	Prostata, Uterus oder Vagina
T4b	Becken- oder Bauchwand
N Nodalstatus	
NX	Keine Beurteilung möglich
N0	Keine regionalen Lymphknotenmetastasen
N1	Befall eines Lymphknotens, maximal 2 cm durchmessend
N2	Befall eines Lymphknotens, 2,1 – 5 cm durchmessend / multiple Lymphknotenmetastasen
N3	Lymphknotenmetastase ≤ 5 cm
M Fernmetastasen	
MX	Keine Beurteilung möglich
M0	Keine Fernmetastasen vorhanden
M1	Fernmetastasen vorhanden
R Residualtumor	
R1	Nur mikroskopisch erkennbare Tumorreste nach Operation
R2	Auch makroskopisch erkennbare Tumorreste nach Operation
L1 Lymphgefäßinvasion	
V1 Blutgefäßinvasion	

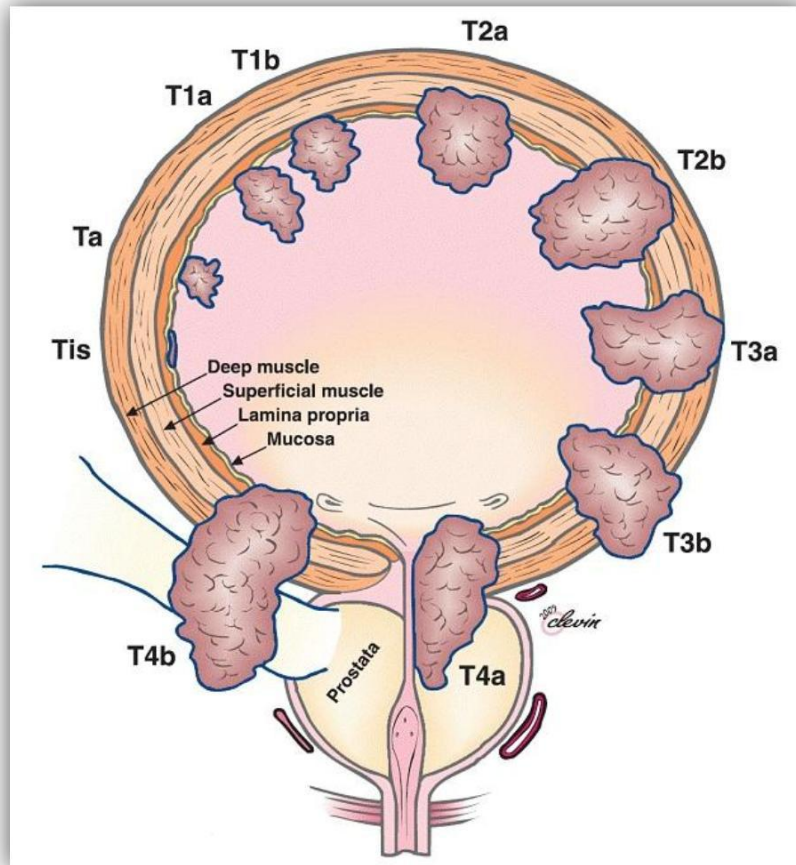


Abbildung 54: Schema der Stadieneinteilung des Harnblasenkarzinoms

Grafik wurde aus der dänischen Guideline des Harnblasenkarzinoms entnommen und modifiziert ²²⁹

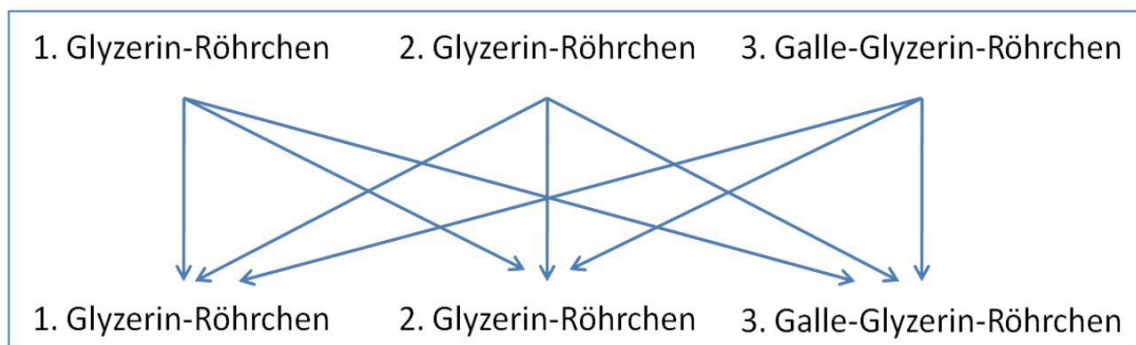


Abbildung 55: Anzuchtverfahren des BCG S4-Jena Stammes in den Glyzerin- und Galle-Glyzerin-Röhrchen

Die BCG wurden je zu $\frac{1}{3}$ auf die verschiedenen Roux-Röhrchen verteilt

8.2 Material

8.2.1 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Autoklav 3850 ELV	Tuttnauer, Breda, Niederlande
BAL-TEC-SCD-005 Sputter Coater	BAL-TEC (Leica), Wetzlar
Bench Biowizard Xtra	KOJAIR®, Vilppula, Finland
Bruker Avance NMR Spektrometer	Bruker-Biospin, Karlsruhe
Brutschrank Heraeus	Thermo Scientific, Langenselbold
Durchlichtmikroskop Telawal 31	Zeiss, Jena
Eismaschine StreamIce®	Ziegra, Isernhagen
ELISA Tecan sunrise	Tecan, Trading AG, Mainz
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Labofuge 200	Thermo Scientific, Langenselbold
LEO-1450VP	Zeiss, Jena
Magnetrührer RE 1-K	KAMAG IKA, Staufen
Microwelle KOR 860 A	DAEWOO, Butzbach
Nanod rop	Thermo Scientific, Langenselbold
pH-Meter 523	Bender & Hobein, München
Prazisionswaage ALC Acculab	Sartorius AG, Göttingen
Taumler Polymax 1040	Heidolph, Kelheim
Termocycler T3000	BIOMETRA, Göttingen
Termomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Ultraschallbad Transsonic digital	ELMA® GmbH & Co KG, Singen
Waage ECON	Sartorius AG, Göttingen
Wasserbad 1003	GFL®, Hannover
Zentrifuge minispin	Eppendorf, Hamburg

8.2.2 Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
Agarose	Merck KGaA, Darmstadt
Aceton	Merck KGaA, Darmstadt
Aprotinin	Sigma-Aldrich®, Deisenhofen
CDCl ₃	Merck KGaA, Darmstadt
Cy3	DYOMICS GmbH, Jena
Cy5	DYOMICS GmbH, Jena
DAPI	Boehringer, Mannheim
Desoxycholsäure	Carl Roth GmbH&Co., Karlsruhe
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
EDTA 0,02 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Ethidiumbromide	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Fetales Kälberserum	GIBCO®, Invitrogen, Karlsruhe
FITC-AnnexinV	Biotium, Hayward USA
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt
KCl	Merck KGaA, Darmstadt
KHPO ₄	Merck KGaA, Darmstadt
Leupeptin	Serva GmbH, Heidelberg
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
NaCl	Merck KGaA, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄	Merck KGaA, Darmstadt
PMSF	Serva GmbH, Heidelberg
D-MEM Medium	GIBCO®, Invitrogen, Karlsruhe
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trichloressigsäure 20 %	Carl Roth GmbH&Co., Karlsruhe
TRIS	Serva GmbH, Heidelberg
Triton X100	Merck KGaA, Darmstadt
Trypanblau 0,4 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trypsin / EDTA	Biochrom AG, Berlin

8.2.3 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
6/12/24/96-well Platten	Greiner GmbH, Frickenhausen
Falcon 15 ml/ 50 ml	Greiner GmbH, Frickenhausen
Kryoröhrchen	Greiner GmbH, Frickenhausen
Kulturflaschen (25 cm, 75 cm ²)	Greiner GmbH, Frickenhausen
Lab-Arraytor® human 60-inflammation	SIRSLab, Jena
Lab-Tek™ Chamber Slides	Nunc™ GmbH & Co.KG, Langenselbold
Neubauer-Kammer	VWR, Darmstadt
Plug-molds	BIO-RAD, München

8.2.4 Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
PBS-Puffer, pH 7,4	<ul style="list-style-type: none"> • 80 g NaCl • 2 g KCL • 11,6 g Na₂HPO₄ • 2 g KHPO₄ • ad 1 l Aqua dest

RIPA	<ul style="list-style-type: none"> • 100 ml Aqua dest. • 0,877 g NaCl • 0,788 g TRIS-Hydrochlorid • 1,0 g Desoxycholsäure • 0,1 g SDS • 1 ml Triton X100
Protein-Zelllysepuffer	<ul style="list-style-type: none"> • Je 1 ml RIPA Puffer • 100 g/ ml PMSF • 2 µg/ ml Leupeptin • 50 µg/ ml Aprotinin
EC-Puffer	<ul style="list-style-type: none"> • 6 mM Tris • 1 mM NaCl • 100 mM EDTA • 0,5 % Brij58 • 0,5 % Desoxycholate-acid • 0,5 % N-Lauroyl-Sacosin • 2 mg/ml Lysozyme
TE-Puffer	<ul style="list-style-type: none"> • mM Tris • 1 mM EDTA • pH 7.5
Internalisierungspuffer	<ul style="list-style-type: none"> • 50 mM Na₂CO₃, • 100 mM NaCl • pH 9,2
Agarose-TEN-Puffer	<ul style="list-style-type: none"> • 50 mM TRIS • 250 mM EDTA • 200 mM NaCl • 2,6 % Agarose in A.dest
Pipespuffer	<ul style="list-style-type: none"> • 0,1% TritonX-100 • 2,0 mM MgCl₂ • 0,1 M NaCl • 10,0 M Pipes

8.2.5 Enzyme

Name	Hersteller
Vsp I	HYBAID GmbH, Heidelberg

8.2.6 Antikörper

Name	Organismus	Label	Verdünnung Mikroskop	Verdünnung Durchfluss- zytometer	Firma
Anti-BCG	Kaninchen		1 : 100	1 : 1.000	Biogenesis
Anti-Kaninchen	Ziege	Alexa Fluor 488	1 : 100	1 : 1.000	Invitrogen
Anti-Kaninchen	Ziege	Alexa Fluor 555	1 : 100	1 : 2.000	Invitrogen
Anti Maus	Kaninchen	Alexa Fluor 488	1 : 100	1 : 2.000	Invitrogen
Anti Maus	Kaninchen	Alexa Fluor 555	1 : 100	1 : 2.000	Invitrogen
Anti-Kaninchen	Ziege	PE	1 : 100	1 : 2.000	Cell Lab

8.2.7 Kommerziell erhältliche Kits

Bezeichnung	Firma
Cell Proliferation Reagent WST-1	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Caspases 3&7 Apoptosis Detection Kit	Immunochemistry, Bloomington, USA
RNAesy Mini Kit	Qiagen, Hilden
FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit II	BD Pharmingen™, Franklin Lakes, USA

8.2.8 LSM Farbstoffe

Name	Anregung	Emission	Laser
DAPI	358 nm	463 nm	Dioden-Laser (405 nm)
Höchst	352 nm	455 nm	Dioden-Laser (405 nm)
PE	565 nm	576 nm	Helium-Neon-Laser (543 nm)
PI	538 nm	617 nm	Helium-Neon-Laser (543 nm)
FITC	495 nm	517 nm	Argon-Laser (488 nm)
Alexa Fluor 488	499 nm	520 nm	Argon-Laser (488 nm)
Alexa Fluor 555	553 nm	568 nm	Helium-Neon-Laser (543 nm)

8.2.9 Software

Bezeichnung	Hersteller
Elisa Magellan 6	Tecan, Trading AG, Mainz
Excel	Microsoft, Unterschleißheim
hsqetgp-Pulssequenz	Bruker-Biospin, Karlsruhe
Rotor-Gene Analysis Software V4.6.64	Corbett Research, Qiagen, Hilden
SPSS 15	SPSS, Chicago, USA
TOPSPIN 2.0	Brukner, Karlsruhe

Wissenschaftliche Beiträge und Veröffentlichungen

ORIGINALARBEITEN

Schwarzer K., Foerster M., Steiner T., Hermann I-M., Straube E.: BCG strain S4-Jena: An early BCG strain is capable to reduce the proliferation of bladder cancer cell by induction of apoptosis. *Cancer Cell International*. *Cancer Cell Int.* 2010 Jun 29;10(1):21

Yu H., Schwarzer K., Förster M., Kniemeyer O., Forsbach-Birk V., Straube E., Rödel J. (2010): Role of HMGB1 and PARP-1 degradation in *Chlamydia trachomatis* - induced cytopathicity. *Infection and Immunity*, July 2010, p. 3288-3297 Vol.78, No7

Foerster M., Rödel J., Schwarzer K., Kroegel C.: *Chlamydia pneumoniae* directly induces proinflammatory responses in human $\gamma\delta$ T-lymphocytes dependent on cell-triggered bacterial uptake. *Journal of Cellular Physiology* (under review)

Andi Krumbholz, Anja Philipps, Hartmut Oehring, Katja Schwarzer, Annett Eitner, Peter Wutzler, Roland Zell : Current Knowledge on PB1-F2 of Influenza A Viruses. (To be submitted to *Medical Microbiology and Immunology*)

Schwarzer K., Foerster M., Yu H., Hermann IM., Straube E.: Internalisation of *Mycobacterium bovis* ssp. *Bacillus-Calmette-Guerin* in bladder cancer cell lines induced cell cycle arrest followed apoptosis. (in process)

VORTRAG

Schwarzer K., Hermann I., Straube E. (2005): Suppression of bladder carcinoma cells by *Bacillus Calmette Guérin* (BCG)- Comparison of different strains. *Int. J. of Med Microbiol* 296:suppl.3: 36 ZMP01 (DGHM)

ABSTRACT/POSTER

Schwarzer K., Eitner A., Foerster M. Straube E. (2008): BCG S4-Jena strain: Influence on the molecular mechanism of bladder cancer cell lines. DGU Congress. Posterpreisnominierung

Schwarzer K., Eitner A., Foerster M. Straube E. (2007): Inhibition of proliferation of superficial bladder cancer cell after infection with mycobacterium BCG by cell cycle arrest and apoptosis. *Int. J. of Med Microbiol* 297:suppl.1: 49 FTP31 (DGHM 2007)

Schwarzer K., Weisser H., Hermann I., Straube E. (2006): The proliferation is associated with the adherence of mycobacterium *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG). VAAM-Jahrestagung PB09

Schwarzer K., Lehmann M., Hanemann V., Straube E. (2005): Differential gene expression in different bladder cancer cell lines treated with *Bacillus Calmette-Guérin* *Int. J. of Med Microbiol* 296:suppl.3: 36 ZMP19 (DGHM)

Schwarzer K., Hermann I., Straube E. (2005): Suppression of bladder carcinoma cells by *Bacillus Calmette Guérin* (BCG)- Comparison of different strains. *Int. J. of Med Microbiol* 296:suppl.3: 36 ZMP01 (DGHM 2005)

Schwarzer K., Weisser H., Lehmann M., Hanemann V., Straube E. (2005): Differential gene expression in *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG)-treated and -untreated human bladder carcinoma cell line T24. CCLM-Jahrestagung A194

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Medizinische Mikrobiologie der Friedrich-Schiller-Universität, Jena angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. E. Straube für die Möglichkeit, an diesem Projekt arbeiten zu können. Ich danke ihm auch für seine Ideen, Hilfsbereitschaft, die freundliche Atmosphäre und seine ansteckende Begeisterungsfähigkeit für das BCG-Projekt.

Bei meinen Kollegen Prof. Pfister, Michael Baier, Beate Hermann, Katharina Boden, Uwe Lang, Svea Sachse, Yu Hang-Xing, Jürgen Rödel, Andi Krumbholz, Christina Große und Katharina Wolf möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit, Hilfsbereitschaft und die fantastische Arbeitsatmosphäre bedanken. Vor allem danke ich Beate und Katharina für ihre Freundschaft und ihre herzliche und fröhliche Art den Alltag im Labor und Büro zu erhellen.

Für die gute Zusammenarbeit und das super Arbeitsklima bedanke ich mich bei der Firma SIRSLab und besonders bei Dr. Karen Felsmann und Dr. Vera Hannemann die mich immer als Teil ihrer Gruppe behandelt haben. Durch Ihre Unterstützung ist die vorliegende Arbeit sehr bereichert worden.

Inge-Marie Hermann danke ich für die Anfertigung der REM-Aufnahmen.

Danke auch an Annett Eitner die mir die Faszination der Laser Scanning Mikroskopie nahebrachte.

Vielen Dank auch an meine Korrekturleser Esther Fröhlich und Martin Förster.

Ein großes Dankeschön an Dr. Schneider vom Max-Planck-Institut für chemische Ökologie, Jena und Dr. Lalk von der Universität Greifswald für die Hilfe bei der Mycolactonanalyse.

Meinen Freunden, besonders Esther Fröhlich, Sabine Schmidt, Martin Förster, Yu Hang-Xing und Nicole Hertel möchte ich danken, dass sie mich immer wieder aufgebaut und motiviert haben.

Meinen Eltern und meiner gesamten Familie danke ich für die stete Unterstützung und den Glauben an mich: Danke!

Nicht zuletzt gilt mein Dank allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Medizinische Mikrobiologie der FSU Jena für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die gute Zusammenarbeit.

Lebenslauf

NAME: KATJA SCHWARZER
GEBURTSDATUM: 11. 03. 1979
GEBURTSORT: GERA
VATER: VOLKMAR SCHWARZER
MUTTER: GABRIELE SCHWARZER
GESCHWISTER: JÖRG SCHWARZER, UWE SCHWARZER
FAMILIENSTAND: LEDIG

SCHULAUSBILDUNG

1985 – 1989 GRUNDSCHULE GERA-LUSAN
1989 – 1995 REALSCHULE GERA-LANGENBERG
1995 – 1998 ZABELGYMNASIUM GERA

HOCHSCHULAUSBILDUNG

2007 – 2010 PROJEKTLITER, PROINNO II
„DIFFERENZIERTE REZIDIVPROPHYLAXE DES OBERFLÄCHIGEN
BLASENKARZINOMS: MOLEKULARE THERANOSTIK AUF FOKUSSierten
RESPONDERARRAY; IDENTIFIZIERUNG VON MARKERGENEN, UM EINE
OPTIMALE THERAPIE DES HARNBLASENKARZINOMS ZU EVALUIEREN“

2005 – 2010 DOKTORARBEIT: UNIVERSITÄTSKLINIKUM JENA, INSTITUT FÜR
MEDIZINISCHE MIKROBIOLOGIE

2003 – 2005 MAX PLANCK INSTITUT FÜR CHEMISCHE ÖKOLOGIE
WISSENSCHAFTLICHE HILFSKRAFT

2003 - 2005 DIPLOMARBEIT: UNIVERSITÄTSKLINIKUM JENA, INSTITUT FÜR
PHARMAKOLOGIE UND TOXIKOLOGIE
„DIE WIRKUNGSWEISE VON KOLLAGENSYNTHESEHEMMERN AUF DIE
CHRONISCHE NIERENINSUFFIZIENZ“

2001 - 2005 BIOLOGIEHAUPTSTUDIUM AN DER FRIEDRICH-SCHILLER-UNIVERSITÄT
JENA
HAUPTFACH: MIKROBIOLOGIE
NEBENFÄCHER: PHARMAKOLOGIE, GENETIK

1999 - 2001 BIOLOGIEGRUNDSTUDIUM AN DER FRIEDRICH-SCHILLER-UNIVERSITÄT
JENA

1998 - 1999 BIOLOGIEGRUNDSTUDIUM AN DER ALBERT-AUGUST-UNIVERSITÄT
GÖTTINGEN

SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

Jena, 27.08.2010

Katja Schwarzer

ERKLÄRUNG ZUR BEWERBUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich mich mit der vorliegenden Arbeit an keiner anderen Hochschule um den akademischen Grad Doctor rerum naturalium beworben habe und dass ich weder früher noch gegenwärtig die Eröffnung des Verfahrens zum Erwerb des o.g. Grades an einer anderen Hochschule beantragt habe. Die Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der FSU Jena ist mir bekannt.

Jena, 27.08.2010

Katja Schwarzer